

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
18. September 2003 (18.09.2003)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 03/076391 A2(51) Internationale Patentklassifikation⁷: C07C 233/00(74) Anwalt: BÖSL, Raphael; Isenbruck Bösl Hörschler
Wichmann Huhn, Prinzregentenstr. 68, 81675 München
(DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP03/02489

(22) Internationales Anmeldedatum:
11. März 2003 (11.03.2003)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(81) Bestimmungsstaaten (*national*): AE, AG, AL, AM, AT,
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR,
CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE,
GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR,
KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK,
MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU,
SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA,
UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.(30) Angaben zur Priorität:
102 10 592.8 11. März 2002 (11.03.2002) DE
102 45 059.5 26. September 2002 (26.09.2002) DE
102 61 435.0 28. Dezember 2002 (28.12.2002) DE(84) Bestimmungsstaaten (*regional*): ARIPO-Patent (GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),
eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,
TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE,
DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL,
PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG,
CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).(71) Anmelder (*für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von
US*): CURACYTE AG [DE/DE]; Gollierstr. 70 B, 80339
München (DE).

Veröffentlicht:

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu
veröffentlichen nach Erhalt des Berichts

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (*nur für US*): STÜRZEBECHER,
Jörg [DE/DE]; Hubertusstrasse 38, 99094 Erfurt (DE).
STEINMETZER, Torsten [DE/DE]; Ricarda-Huch Weg
23, 07743 Jena (DE). SCHWEINITZ, Andrea [DE/DE];
Gustav-Fischer-Strasse 15, 07745 Jena (DE).Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen
Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on
Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe
der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: UROKINASE INHIBITORS, PRODUCTION AND USE THEREOF

(54) Bezeichnung: HEMMSTOFFE DER UROKINASE, IHRE HERSTELLUNG UND VERWENDUNG

(57) Abstract: The invention relates to novel inhibitors of urokinase, to the production thereof and to the use of the same for the
treatment, prophylaxis and diagnosis of a tumour, in particular for reducing the formation of tumour metastases.(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft neue Hemmstoffe der Urokinase, ihre Herstellung und Verwendung zur Therapie,
Prophylaxe und Diagnose eines Tumors, insbesondere zur Reduzierung der Bildung von Tumormetastasen.

WO 03/076391 A2

Hemmstoffe der Urokinase, ihre Herstellung und Verwendung

Die Erfindung betrifft neue Hemmstoffe der Urokinase, ihre Herstellung und
5 Verwendung zur Therapie, Prophylaxe und Diagnose eines Tumors, insbesondere
zur Reduzierung der Bildung von Tumormetastasen.

Die Ausbreitung und Metastasierung solider Tumoren in umgebendem Gewebe
wird durch ihre Fähigkeit, die extrazelluläre Matrix in der Umgebung der
10 Tumorzelle abzubauen bzw. die Basalmembran zu durchdringen, ermöglicht. In
diesem Prozess kommt neben verschiedenen Matrixmetalloproteinasen und
Cathepsinen vor allem dem Plasminogenaktivator Urokinase (uPA) eine zentrale
Bedeutung zu (P. Mignatti und D.B. Rifkin, Physiol. Rev. 73, 161-195, 1993). So
bewirkt uPA die Aktivierung von Plasminogen; das entstehende Plasmin kann die
15 Komponenten der extrazellulären Matrix (Fibrin, Fibronectin, Laminin,
Proteoglykane u.a.) abbauen sowie Metalloproteasen und pro-Urokinase zu uPA
aktivieren (U. Reuning et al., Int. J. Oncol. 13, 893-906, 1998).

Sowohl pro-Urokinase als auch uPA binden an den uPA-Rezeptor (uPAR), einen
20 an der Zelloberfläche lokalisierten, spezifischen Rezeptor. Dadurch wird eine
Verstärkung und Fokussierung der Aktivität von uPA und damit der
Plasminogenaktivierung in der direkten Umgebung der Tumorzelle erreicht.
Sowohl in zellbiologischen Studien als auch in Tiermodellen konnte die
Bedeutung dieses zellassozierten Plasminogenaktivator-Systems für Tumor-
25 wachstum und -ausbreitung gezeigt werden. So wird das invasive Potential von
Tumorzellen bei Hemmung der enzymatischen Aktivität von uPA durch die
natürlichen Inhibitoren PAI-1 und PAI-2 herabgesetzt (J.-F. Cajot et al., Proc.
Natl. Acad. Sci. USA 87, 6939-6943, 1990; M. Baker et al., Cancer Res. 50,

4876-4684, 1990). In Hühnerembryonen konnte durch Zugabe von Antikörpern gegen uPA die durch menschliche Karzinomzellen verursachte Bildung von Lungenmetastasen fast vollständig verhindert werden (L. Ossowski et al., Cell 35, 611-619, 1983).

5

Die Faktoren des Plasminogenaktivator-Systems (uPA, uPAR, PA1-1 und PAI-2) sind in den letzten Jahren hinsichtlich ihrer klinischen Relevanz für die Prognose von Patienten mit soliden malignen Tumoren intensiv untersucht worden. Insbesondere der Gehalt von uPA im Gewebe verschiedener Tumoren erwies sich
10 als ein Prognosefaktor. So haben Patienten mit hohem uPA-Spiegel eine schlechtere Prognose als solche mit niedriger uPA-Konzentration im Tumor (M. Schmitt et al., Thromb. Haemost. 78, 285-296, 1997; R.W. Stephens et al., Breast Cancer Res. Treat. 52, 99-111, 1998). Auch eine erhöhte Konzentration an uPAR im Tumorgewebe korreliert mit einer schlechten Prognose (H. Pedersen et al.,
15 Cancer Res. 54, 4671-4675, 1994; C. Duggan et al., Int. J. Cancer 61, 597-600, 1995).

Aus den Befunden zum prognostischen Wert des uPA- und uPAR-Gehaltes im Tumorgewebe kann angenommen werden, dass synthetische uPA-Inhibitoren in
20 der Lage sind, Invasion und Ausbreitung von Tumorzellen zu unterdrücken. Die Zahl der bisher bekannten uPA-Hemmstoffe ist allerdings relativ klein. Die Mehrzahl besitzt nur eine geringe Spezifität und Wirkungsstärke, wie es für verschiedene Benzamidin- und β -Naphthamidin-Derivate zutrifft (J. Stürzebecher und F. Markwardt, Pharmazie 33, 599-602, 1978). Das von Vassalli und Belin
25 (FEBS Letters 214, 187-191, 1997) als uPA-Hemmstoff beschriebene Amilorid ist zwar ein spezifischer, aber schwacher Inhibitor von uPA ($K_i = 7 \mu\text{M}$).

Stärker wirksame uPA-Inhibitoren wurden mit 4-substituierten Benzothiophen-2-carboxamidinen ($K_i = 0,16 \mu\text{M}$ für Verbindung B-623) gefunden. Hemmstoffe
30 dieses Typs inaktivieren auch uPA, die an uPAR gebunden ist (M.J. Towle et al.,

Cancer Res. 53, 2553-2559, 1993). Die Benzothiophen-Derivate sind sehr spezifisch, ihre Hemmwirkung gegenüber Plasmin und dem Plasminogenaktivator vom Gewebetyp (tPA) ist gering, allerdings ist die Synthese von Verbindungen dieses Typs sehr aufwändig.

5

Eine vergleichbare Spezifität haben auch 4-Aminomethylphenylguanidin-Derivate, deren Hemmwirkung gegenüber uPA ($K_i = 2,4 \mu\text{M}$ für die wirksamste Verbindung) allerdings vergleichsweise gering ist (S. Sperl et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97, 5113-5118, 2000).

10

Im Gegensatz dazu erreichen N α -Triisopropylphenylsulfonyl-3-amidinophenylalanin-Derivate mikromolare K_i -Werte ($0,41 \mu\text{M}$ für die wirksamste Verbindung), sind allerdings sehr unspezifische uPA-Hemmstoffe, mit gleicher oder stärkerer Wirkung werden Trypsin, Thrombin und Plasmin inhibiert (J. Stürzebecher et al., Bioorg. Med. Letters 9, 3147-3152, 1999). Sehr wirksame uPA-Hemmstoffe sind in der WO 99/05096 und WO 01/81314 mit weiterentwickelten β -Naphthamidinen offenbart. Es werden IC_{50} -Werte im nanomolaren Bereich beschrieben, allerdings keine Angaben zur Selektivität und der biologischen Wirksamkeit gemacht.

20

Bisher wurden nur wenige Peptide als uPA-Hemmstoffe beschrieben, die sich von der Substrat-Sequenz ableiten. Kettner und Shaw (Methods in Enzymology, 80, 826-842, 1981) beschrieben Chlormethylketone, die zwar uPA irreversibel hemmen, aber nicht für in vivo-Anwendung geeignet sind.

25

In der EP 18 32 71 sind Lysin-Derivate offenbart, die eine gewisse uPA-Hemmung bewirken, allerdings auch andere vergleichbare Enzyme hemmen und damit nur sehr speziell bzw. eingeschränkt für medizinische Zwecke verwendbar sind. Gleiches gilt für die in der WO 95/17 8 85 als uPA-Inhibitoren

beschriebenen niedermolekularen Polypeptide (ca. 50 Aminosäuren), die sich von natürlichen Hemmstoffen ableiten. Auf Grund ihres Peptidcharakters und der Molekülgröße ist ihr in vivo-Einsatz stark eingeschränkt. In jüngster Zeit wurden in WO 00/05245 Peptidylaldehyde mitgeteilt, die C-terminal ein Arginal und in

5 P3 ein D-Serin enthielten und uPA sehr wirksam hemmten. Nach Acylierung des D-Ser-Hydroxyl konnte für die Leitverbindung iBuOCO-D-Ser-Ala-Arg-H nach s.c.-Gabe eine relative Bioverfügbarkeit von 87 % beobachtet werden (S. Y. Tamura et al. Bioorg. Med. Chem. Lett. 10, 983-987, 2000). In PCT/EP WO 01/96286 werden Hemmstoffe offenbart, die sich von acyliertem

10 Amidinobenzylamin ableiten und neben einer natürlichen Aminosäure in P2 ein D-Serin oder eine vergleichbare unnatürliche Aminosäure in P3 enthalten. Verbindungen diese Typs hemmen Urokinase ($K_i = 36$ nM für die wirksamste Verbindung) sehr effektiv. Allerdings haben Verbindungen diese Typs nur unzureichende pharmakokinetische Eigenschaften für eine Anwendung in vivo;

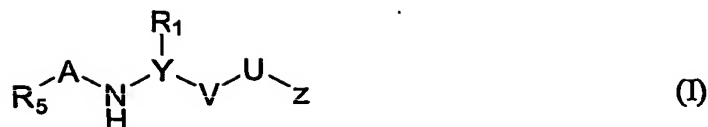
15 sie werden nach oraler Gabe kaum resorbiert und im Versuchstier nach i.v.-Gabe sehr schnell aus der Zirkulation eliminiert (Künzel et al., Bioorg. Med. Chem. Lett. 12, 645-648 (2002)). In WO 02/14349 werden weitere nicht-kovalent bindende Urokinase-Hemmstoffe beschrieben, die neben den bereits in WO 01/96286 beschriebenen acylierten Amidinobenzylaminen z.B. acyliertes

20 Guanidinobenzylamin, 2-Amidino-5-Aminomethylthiophen und andere Arginin-Mimetika als P1-Rest besitzen.

Der Erfindung liegt daher die Aufgabe zu Grunde, einen auch für therapeutische Anwendungen geeigneten Wirkstoff anzugeben, der Urokinase mit hoher

25 Aktivität hemmt und der nach i.v.- oder s.c.-Gabe möglichst lange im Körper zirkuliert.

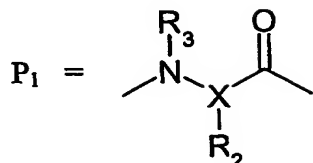
Überraschend wurde gefunden, dass acyliertes Amidinobenzylamin gemäß der im Patentanspruch 1 angeführten allgemeinen Formel I



wobei

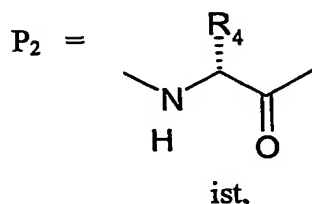
A P_2-P_1 mit

5



und

10



- 15 insbesondere Verbindungen des 4-Amidinobenzylamins, bei denen X, R_2 , R_3 und R_4 natürliche und/oder unnatürliche Aminosäuren ergeben, dann sowohl Urokinase sehr wirksam inaktivieren als auch insbesondere nach i.v.- oder s.c.-Gabe langsam aus der Zirkulation eliminiert werden, wenn neben der Amidinofunktion weitere geladene Gruppen, vorzugsweise Carboxyl, Amino,
- 20 Amidino, Hydroxyamidino, Amidrazono oder Guanidino eingeführt werden. Die Carboxylgruppen können auch geschützt in Form ihrer Ester vorliegen, wobei bevorzugt Ethylester Verwendung finden. Diese Ester werden in vivo teilweise in die freien Säuren umgewandelt.

- 25 Das oben Gesagte gilt in gleicher Weise für acyliertes Guanidinobenzylamin.

Die Benennung der Reste P_2 und P_1 in dem Struktursegment A der allgemeinen Formel I bezieht sich nicht auf die sonst üblicherweise verwendete Nomenklatur der Aminosäurereste in Peptidsubstraten von Serinproteasen und davon

30 abgeleiteten Inhibitoren, wie sie von Schechter und Berger eingeführt wurde

(Schechter und Berger, Biochem. Biophys. Res. Comm. 27, 157-162 (1967)). In allen Teilen der Erfindung, d.h. sowohl in der Beschreibung als auch in den Ansprüchen gelten die folgenden Definitionen:

- 5 Der Buchstabe P in Zusammenhang mit einer Zahl von 1 bis 3 in normaler Schrift, d.h. P₁, P₂ oder P₃, wird für Aminosäurereste und deren Derivate entsprechend der Nomenklatur von Schechter und Berger verwendet. Dagegen steht der Buchstabe P in Zusammenhang mit einer tiefgestellten 1 oder 2, d.h. P₁ oder P₂, für Aminosäurereste und deren Derivate als Bestandteile der Struktur A
10 in Formel I der vorliegenden Erfindung. Dabei entspricht die in der L-Konfiguration vorliegende substituierte oder unsubstituierte natürliche oder unatürliche Aminosäure P₁ in der Struktur A P₂ nach Schechter und Berger und die in der D-Konfiguration vorliegende substituierte oder unsubstituierte natürliche oder unatürliche Aminosäure P₂ in der Struktur A entspricht P₃ nach
15 Schechter und Berger.

In Formel I ist

- R₁ ein H oder -(CH₂)_aCOOR₆ mit a = 0, 1, 2, 3, 4 oder 5, vorzugsweise mit a = 0, 1 oder 2, ist, wobei R₆ ein verzweigter oder unverzweigter Alkylrest mit
20 vorzugsweise 1 bis 6 C-Atomen, insbesondere 1 bis 3 C-Atomen, vor allem Ethyl;

- R₂ ist ein H, ein verzweigter oder unverzweigter Alkylrest mit 1 bis 8 C-Atomen vorzugsweise mit 1 bis 3 C-Atomen, oder
-(CH₂)_cCOOR₈ mit c = 1, 2, 3 oder 4, wobei R₈ H oder ein verzweigter oder
25 unverzweigter Alkylrest mit vorzugsweise 1 bis 6 C-Atomen, insbesondere 1 bis 3 C-Atomen, vor allem Ethyl, oder
-(CH₂)_d-OR₉ mit d = 1, 2, 3 oder 4, wobei R₉ H ist, oder
-(CH₂)_eOR₁₀, -(CH₂)_eSR₁₀, -(CH₂)_e-Guanidino, -(CH₂)_e-Imidazol oder
-(CH₂)_eNHR₁₀ mit e = 1, 2, 3, 4 oder 5, wobei R₁₀ H, ein verzweigter oder
30 unverzweigter Alkylrest mit 1-16, insbesondere 1-8, vor allem 1-3 C-Atomen oder ein substituiertes oder unsubstituiertes Aryl-, Heteroaryl-, Aralkyl- oder

Heteroaralkylrest ist, wobei der Alkylrest vorzugsweise 1 bis 16, insbesondere 1 bis 8, vor allem 1 bis 3 C-Atome, und der Aryl- oder Heteroarylrest vorzugsweise 4 bis 14, insbesondere 6 bis 10, vor allem 6 C-Atome und vorzugsweise 1 bis 3 N als Heteroatom besitzt, oder

- 5 $-(CH_2)_kO-CO-OR_{16}$ mit $k = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7$ oder 8, wobei R_{16} ein verzweigtes oder unverzweigtes Alkyl mit 1-16, vorzugsweise 1-8, insbesondere 1-4, vor allem 1-2 C-Atomen, ein substituierter oder unsubstituierter Aryl-, Heteroaryl-, Aralkyl- oder Heteroaralkylrest, ein Adamantyl-, ein Campher-, ein Cyclohexylmethylrest, vorzugsweise Benzyl ist;

10

- R_3 ist ein H oder $-(CH_2)_bR_7$ mit $b = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7$ oder 8, vorzugsweise mit $b = 2$ oder 3, ist, wobei R_7 H, ein verzweigter oder unverzweigter Alkylrest mit 1 bis 10 C-Atomen, vorzugsweise mit 1 bis 3 C-Atomen, oder ein geladener Rest, vorzugsweise einer $-(CH_2)_jCOOR_{13}$, $-(CH_2)_jSO_2R_{13}$, $-(CH_2)_jNH_2$,
 15 $-(CH_2)_j$ -Amidino-, $-(CH_2)_j$ -Hydroxyamidino- oder $-(CH_2)_j$ -GuanidinoGruppe mit $j = 0, 1$ oder 2 ist, wobei R_{13} H oder ein Alkylrest mit vorzugsweise 1 bis 6 C-Atomen, insbesondere 1 bis 4, vor allem Ethyl ist;

- R_4 ist ein verzweigter oder unverzweigter Alkylrest mit 1 bis 8, vorzugsweise 1
 20 bis 3, C-Atomen, $-(CH_2)_fOR_{11}$, $-(CH_2)_fSR_{11}$, oder $-(CH_2)_fNHR_{11}$ mit $f = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7$ oder 8, wobei R_{11} H oder $-CO-OR_{17}$ ist, wobei R_{17} ein verzweigtes oder unverzweigtes Alkyl mit 1-16, vorzugsweise 1-8, insbesondere 1-4, vor allem 1-2 C-Atomen, ein substituierter oder unsubstituierter Aryl-, Heteroaryl-, Aralkyl- oder Heteroaralkylrest, ein Adamantyl-, ein Campher-, ein Cyclohexylmethylrest,
 25 vorzugsweise Benzyl ist;

- R_5 ist $-(CH_2)_g(CH_3)_h$, $-(CH_2)_i$ -Aryl mit $g + h = i = 0, 1, 2$ oder 3, $-SO_2R_{12}$, $-COR_{12}$, oder $-COOR_{12}$, wobei R_{12} ein verzweigtes oder unverzweigtes Alkyl mit 1-16, vorzugsweise 1 bis 8, insbesondere 1 bis 4, vor allem 1 bis 2 C-Atomen, ein
 30 substituierter oder unsubstituierter Aryl-, Heteroaryl-, Aralkyl- oder Heteroaralkylrest, ein Adamantyl-, ein Campher-, ein Cyclohexylmethylrest, vorzugsweise Benzyl ist, wobei R_5 mit einer geladenen oder ungeladenen Gruppe,

vorzugsweise einer $-(CH_2)_jCOOR_{13}$, $-(CH_2)_jSO_2R_{13}$, $-(CH_2)_jNH_2$, $-(CH_2)_j$ -Amidino-, $-(CH_2)_j$ -Hydroxyamidino- oder $-(CH_2)_j$ -Guanidino-Gruppe mit $j = 0, 1$ oder 2 modifiziert sein kann, wobei R_{13} H oder ein Alkylrest mit vorzugsweise 1 bis 6 C-Atomen, insbesondere Ethyl, ist;

5

U ist ein Phenyl- oder Cyclohexylrest oder ein Heterophenyl- oder Heterocyclohexylrest mit vorzugsweise mindestens einem N, S oder O als Heteroatom, insbesondere Pyridin, Piperidin oder Pyrimidin;

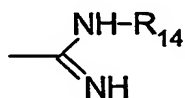
10 V ist $(CH_2)_n$ mit $n = 0, 1, 2$ oder 3 , vorzugsweise 0 ;

X ist N oder CH, vorzugsweise CH;

Y ist N oder $(CH)_m$ mit $m = 0$ oder 1 , vorzugsweise CH;

Z kommt in 3- oder 4-Position vor und ist eine Aminomethyl-, eine Guanidino- oder eine Amidinogruppe

15



, wobei R_{14} H, OH, NH_2 , $-COR_{15}$ oder $-COOR_{15}$ ist, wobei R_{15} ein verzweigter oder unverzweigter Alkylrest mit 1 bis 16, vorzugsweise 1 bis 8, insbesondere 1 bis 4, vor allem 1 bis 2 C-Atomen oder ein substituierter oder unsubstituierter Aryl- oder Heteroaryl-, Aralkyl- oder Heteroaralkylrest ist, wobei der Alkylrest vorzugsweise 1 bis 16, insbesondere 1 bis 8, vor allem 1 bis 4 und besonders bevorzugt 1 bis 2 C-Atome und der Aryl- oder Heteroarylrest vorzugsweise 4 bis 14, insbesondere 6 bis 10, vor allem 6 C-Atome und vorzugsweise 1 bis 3 N als Heteroatom besitzt;

wobei ein oder mehrere geladene Reste vorzugsweise abgeleitet von $-COOH$, $-CH(COOH)_2$, $-SO_2H$, NH_2 , einer Amidino-, Hydroxyamidino-, Amidrazono- oder Guanidinogruppe in den Resten R_1 , R_2 , R_3 oder R_5 vorhanden sind;

30

ebenfalls bevorzugt ist eine Verbindung der allgemeinen Formel I in Form eines Prodrugs oder in Form ihres Salzes.

5 Ein Prodrug im Sinne der vorliegenden Erfindung ist ein acyliertes Amidino- oder Guanidinobenzylamin gemäß der allgemeinen Formel I, das als pharmazeutisch inaktives Derivat der entsprechenden pharmazeutisch wirksamen Substanz vorliegt und nach oraler Gabe spontan oder enzymatisch biotransformiert wird unter Freisetzung der pharmazeutisch wirksamen Substanz.

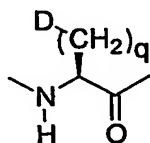
10 Weitere besonders bevorzugte Hemmstoffe der Urokinase, die besonders langsam eliminiert werden, sind 4-Amidinobenzylamin-Derivate gemäß der allgemeinen Formel I, wobei zusätzlich zusätzlich eine mit einer Amino- oder Carboxylgruppe funktionalisierte Oligo- oder Polyalkylenglycolkette, insbesondere eine Poly- oder Oligoethylenglycol- oder Poly- oder Oligopropylenglycolkette direkt an eine funktionelle Gruppe von R₂ insbesondere über eine –NH- oder eine –CO-Gruppe
15 unter Ausbildung einer Amidbindung an R₂ gekoppelt ist, wobei die Oligo- oder Polyalkylenglycolkette zumindest an beiden Enden eine funktionelle Gruppe, insbesondere eine substituierte oder unsubstituierte Amino- und/oder Carboxylgruppe aufweist, oder wobei die Oligo- oder Polyalkylenglycolkette
20 zumindest an einem Ende eine funktionelle Gruppe, insbesondere eine substituierte oder unsubstituierte Amino- und/oder Carboxylgruppe aufweist und am anderen Ende als Alkylether mit 1-4 C-Atomen, insbesondere als Methylether vorliegt, wobei R₂ vorzugsweise $-(CH_2)_n-NH_2$ mit n gleich 1-5, vorzugsweise 4 oder $-(CH_2)_n-COOH$ mit n gleich 1-5, vorzugsweise 1-3 ist.

25

An eine Oligo- oder Polyalkylenglycolkette, die zumindest an beiden Enden eine funktionelle Gruppe, insbesondere eine substituierte oder unsubstituierte Amino- und/oder Carboxylgruppe aufweist, können zwei Moleküle der allgemeinen Formel I gekoppelt werden.

30

Werden die erfindungsgemäßen Derivate des 4-Amidinobenzylamins mit einer Oligo- oder Polyalkylenglykolkette gekoppelt, weist P1 in der Struktur A der allgemeinen Formel I vorzugsweise die folgende allgemeine Formel II auf:



(II),

wobei q gleich 0, 1, 2, 3, 4 oder 5 ist und D gleich Formel III ist

E—F—G— (III),

wobei wenn E gleich eine H₂N-, HOOC-(CH₂)_n-CO-NH-, HOOC-, H₂N-(CH₂)_n-NH-CO- oder HS-Gruppe ist, F gleich ein Oligo- oder Polyalkylenglycol der allgemeinen Formel -(CH₂)_d-[O-CH₂-CH₂]_v-O-(CH₂)_m-(NH-CO-CH₂-O-CH₂)_k- oder -(CH₂)_d-[O-CH(CH₃)-CH₂]_v-O-(CH₂)_m-(NH-CO-CH₂-O-CH₂)_k- mit d = 1, 2, 3 oder 4, v = eine ganze Zahl von 1 bis 1000, bevorzugt 2 bis 250, m = 0, 1, 2, 3 oder 4 und k = 0 oder 1 ist oder wenn E gleich eine CH₃-O-Gruppe ist, F gleich eine Oligo- oder Polyalkylenglykolkette der allgemeinen Formel -(CH₂)_d-[O-CH₂-CH₂]_v-O-(CH₂)_m-(NH-CO-CH₂-O-CH₂)_k- oder -(CH₂)_d-[O-CH(CH₃)-CH₂]_v-O-(CH₂)_m-(NH-CO-CH₂-O-CH₂)_k- mit d = 1, 2, 3 oder 4, v = eine ganze Zahl von 1 bis 1000, bevorzugt 1 bis 250, m = 0, 1, 2, 3 oder 4 und k = 0 oder 1 ist; und G gleich -CO-NH- oder -NH-CO- ist.

Ein besonderer Vorteil von Oligo- und/oder Polyalkylenglycolderivaten der erfindungsgemäßen Urokinasehemmstoffe besteht in ihrer verlängerten Halbwertszeit in der Zirkulation nach systemischer Gabe.

Weitere besonders geeignete Verbindungen sind Verbindungen nach den allgemeinen Formel I, wobei U an 1, 2 oder 3 Positionen vorzugsweise mit einem Halogen, insbesondere Fluor oder Chlor, oder einem Methyl-, Ethyl-, Propyl-, Methoxy-, Ethoxy-, oder Propoxyrest substituiert ist.

Weitere besonders geeignete Verbindungen sind Verbindungen nach den allgemeinen Formeln I, wobei eine Carboxylgruppe als Ester, bevorzugt als Ethylester, geschützt vorliegt.

- 5 Weitere besonders geeignete Verbindungen sind Verbindungen nach den allgemeinen Formeln I oder II, wobei die Verbindung in Form eines Prodrugs vorliegt, wobei R_9 und/oder R_{11} in diesem Fall ein Alkylcarbonyl-, Aralkylcarbonyl-, Alkyloxycarbonyl- oder Aralkyloxycarbonyl-Rest ist, wobei der lineare oder verzweigte Alkylrest vorzugsweise 1 bis 6, insbesondere 1 bis 4
10 C-Atome und der Arylrest vorzugsweise 5 bis 8, insbesondere 6 C-Atome besitzt.

- Weitere besonders geeignete Verbindungen sind Verbindungen nach den allgemeinen Formeln I oder II, wobei im Amidinobenzylamidrest die Amidinogruppe in 4-Position steht und P_2 von der Aminosäure D-Ser abstammt
15 und P_1 von Glycin, Alanin, Serin, Asparaginsäure oder Glutaminsäure abstammt und R_5 ein unsubstituierter oder mit einer Carboxylgruppe versehener Aryl- oder Aralkylsulfonyl-Rest mit 1 bis 16, vorzugsweise 1 bis 8, insbesondere 1 bis 4, vor allem 1 bis 2 C-Atomen im Alkylrest und 6 bis 14, vorzugsweise 6 bis 10, insbesondere 6 C-Atomen im Arylrest ist.

- 20 Weitere besonders geeignete Verbindungen sind Verbindungen nach den allgemeinen Formeln I oder II, wobei im Amidinobenzylamidrest die Amidinogruppe in 4-Position steht und P_2 die Aminosäure D-Ser und P_1 eine natürliche oder künstliche, unsubstituierte oder substituierte basische Aminosäure
25 in der L-Konfiguration bedeutet, beispielsweise Lys, homoLys, Arg, norArg, homoArg, His, Orn, Orn(2-Imidazoliny), Dab, 4-[(2-Amino)Pyrimidinyl]Buttersäure, Dap, Ala[3-(2-Pyrrolidinyl)], Ala[3-Pyrrolidinyl-(2-N-Amidino)], Ala[3-(N-Piperazine-4-N-amidino)], Ala(4-Pip), Ala[4-Pip(N-amidino)], homoAla(4-Pip), Ala[3-Pip(N-amidino)], homoAla(3-Pip),
30 homoAla[4-Pip(N-amidino)], Ala-(3-guanidino), Phe(3-Amidino), Phe(4-Amidino), Phe(3-NH₂), Phe(4-NH₂), Phe(3-Guanidino), Phe(4-Guanidino), Phe[4-(2-imidazoliny)], Phe[3-CH₂-(guanidino)], Phe[4-CH₂-(guanidino)], homoPhe(3-

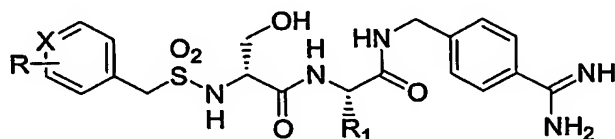
Amidino), homoPhe(4-Amidino), hPhe(3-NH₂), hPhe(4-NH₂), hPhe(3-Guanidino), hPhe(4-Guanidino), cis-Cha(4-NH₂), trans-Cha(4-NH₂), cis-homoCha(4-NH₂), trans-homoCha(4-NH₂), trans-Cha(4-CH₂NH₂), trans-homoCha(4-CH₂NH₂), und wobei R₅ ein mit einer Sulfonylgruppe versehener Aryl- oder Aralkylsulfonyl-Rest mit 1 bis 16, vorzugsweise 1 bis 8, insbesondere 1 bis 4, vor allem 1 bis 2 C-Atomen im Alkylrest und 6 bis 14, vorzugsweise 6 bis 10, insbesondere 6 C-Atomen im Arylrest ist, der an die Aminogruppe des D-Ser gebunden ist, wobei P₁ ganz besonders bevorzugt die Aminosäure Lysin oder Arginin ist.

10

Weitere besonders geeignete Verbindungen sind Verbindungen nach den allgemeinen Formeln I oder II, wobei der Substituent am substituierten Aryl-, Heteroaryl-, Aralkyl- oder Heteroaralkylrest ein Halogen, vorzugsweise Fluor, Chlor oder Brom, insbesondere Fluor oder Chlor, ist.

15

Weitere besonders geeignete Verbindungen sind Verbindungen nach den allgemeinen Formeln I oder II, wobei eine Verbindung der allgemeinen Formel I die folgende Struktur aufweist:



20

mit R gleich COOH oder COOMe in ortho-, meta- oder para- oder H und X gleich CH und R₁ gleich H; oder

R gleich 4-COOH oder 3-COOH mit X gleich CH und R₁ gleich H, CH₃ oder CH₂-OH; oder

25

R gleich 4-CN mit X gleich CH und R₁ gleich CH₃; oder

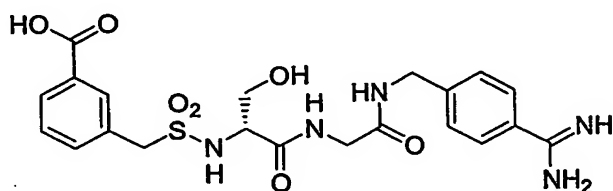
R gleich 4-(NH₂-CH₂) mit X gleich CH und R₁ gleich H; oder

R gleich H mit X gleich CH und R₁ gleich H, CH₂-OH, CH₂-O(Bzl), CH₂-NH₂, CH(OH)CH₃ oder CH(OBzl)CH₃; oder

30 R gleich 4-COOMe mit X gleich CH und R₁ gleich CH₂-OH; oder

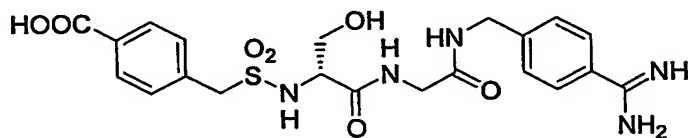
R gleich 4-CL, 4-Me, 4-F oder 3,4-Di-Cl mit X gleich CH und R₁ gleich H; oder
 R gleich H mit X gleich N und R₁ gleich H.

Weitere besonders geeignete Verbindungen sind Verbindungen nach den
 5 allgemeinen Formeln I oder II, wobei eine Verbindung der allgemeinen Formel I
 eine der folgenden Strukturen aufweist:



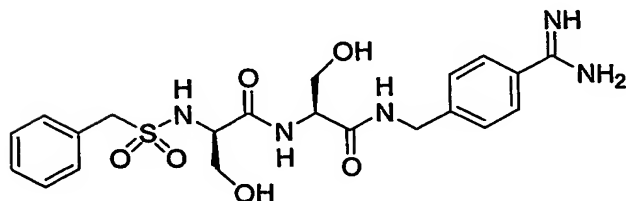
10

oder

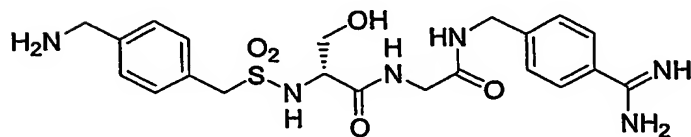


oder

15

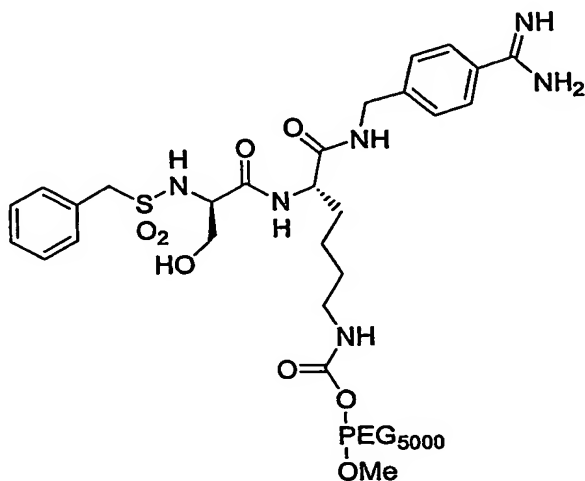


oder



20

Weitere besonders geeignete Verbindungen sind Verbindungen nach den allgemeinen Formeln I oder II, wobei eine Verbindung der allgemeinen Formel I oder II eine der folgenden Strukturen aufweist:

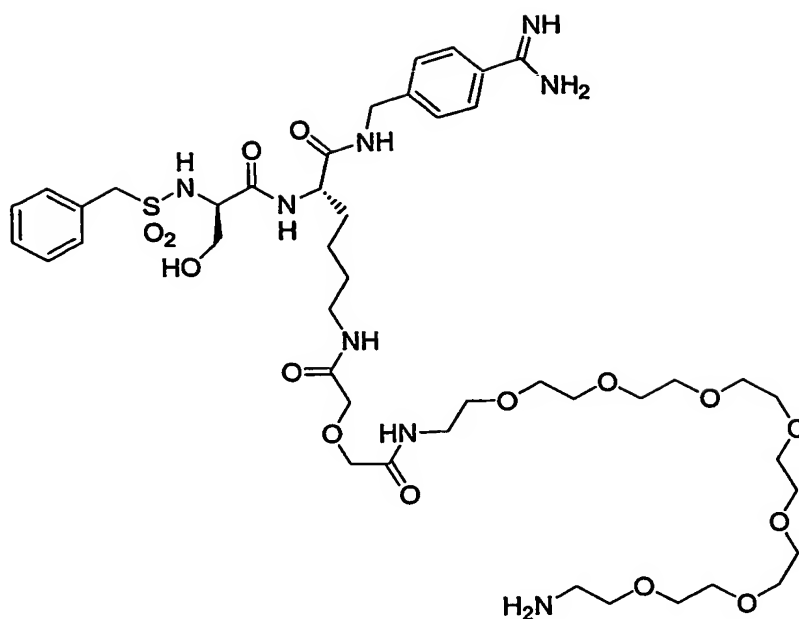


5

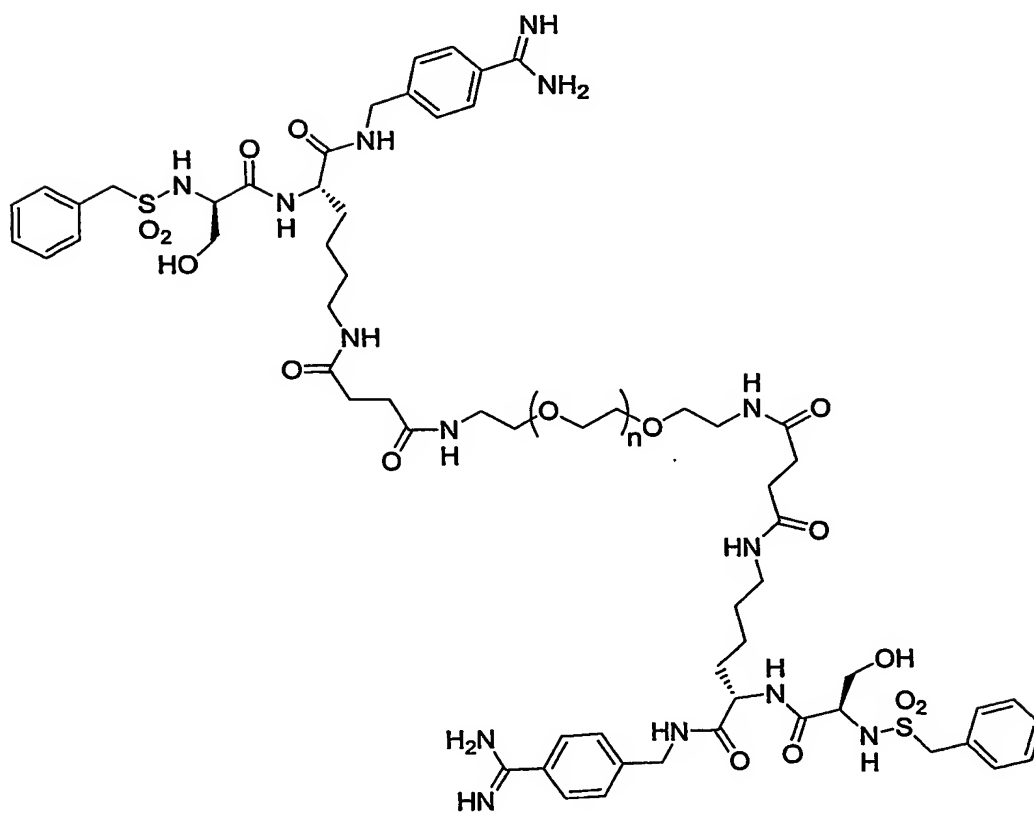
wobei PEG₅₀₀₀ eine Polyethylenglycolkette mit einem durchschnittlichen Molekulargewicht von 5000 Da bedeutet, wobei ebenso Polyethylenglykolketten mit einem durchschnittlichen Molekulargewicht von 100 – 20000 Da verwendet werden können;

10

oder



oder



5

mit $n = 2$ bis 250.

Bei einer starken Inaktivierung von Urokinase werden die zusätzlich geladenen 4-Amidinobenzylamin-Derivate auf vorteilhafte und überraschende Weise sehr langsam eliminiert, so dass die erfindungsgemäßen Verbindungen eine neue Gruppe von hochaktiven Urokinase-Hemmstoffen darstellen.

Beispiele für solche Verbindungen sind neben den in den Ausführungsbeispielen genannten:

- (3-Pyridylmethyl)sulfonyl-dSer-Gly-4-Amidinobenzylamid
- 10 (3-Pyridylmethyl)sulfonyl-dSer-Ala-4-Amidinobenzylamid
- (3-Pyridylmethyl)sulfonyl-dSer-Ser-4-Amidinobenzylamid
- (3-Pyridylmethyl)sulfonyl-dSer-Pro-4-Amidinobenzylamid
- (4-Pyridylmethyl)sulfonyl-dSer-Ala-4-Amidinobenzylamid
- 15 (4-Pyridylmethyl)sulfonyl-dSer-Ser-4-Amidinobenzylamid
- (4-Pyridylmethyl)sulfonyl-dSer-Pro-4-Amidinobenzylamid
- (2-Pyridylmethyl)sulfonyl-dSer-Gly-4-Amidinobenzylamid
- (2-Pyridylmethyl)sulfonyl-dSer-Ala-4-Amidinobenzylamid
- 20 (2-Pyridylmethyl)sulfonyl-dSer-Ser-4-Amidinobenzylamid
- (2-Pyridylmethyl)sulfonyl-dSer-Pro-4-Amidinobenzylamid
- ((3-(Trifluormethyl)phenyl)methyl)-sulfonyl-dSer-Gly-4-Amidinobenzylamid
- ((3-(Trifluormethyl)phenyl)methyl)-sulfonyl-dSer-Ala-4-Amidinobenzylamid
- 25 ((3-(Trifluormethyl)phenyl)methyl)-sulfonyl-dSer-Ser-4-Amidinobenzylamid
- ((3-(Trifluormethyl)phenyl)methyl)-sulfonyl-dSer-Pro-4-Amidinobenzylamid

((4-(Trifluormethyl)phenyl)methyl)-sulfonyl-dSer-Gly-4-Amidinobenzylamid
((4-(Trifluormethyl)phenyl)methyl)-sulfonyl-dSer-Ala-4-Amidinobenzylamid
((4-(Trifluormethyl)phenyl)methyl)-sulfonyl-dSer-Ser-4-Amidinobenzylamid
5 ((4-(Trifluormethyl)phenyl)methyl)-sulfonyl-dSer-Pro-4-Amidinobenzylamid

2-Cl-Benzylsulfonyl-dSer-Gly-4-Amidinobenzylamid
2-Cl-Benzylsulfonyl-dSer-Ala-4-Amidinobenzylamid
2-Cl-Benzylsulfonyl-dSer-Pro-4-Amidinobenzylamid
10 2-Cl-Benzylsulfonyl-dSer-Ser-4-Amidinobenzylamid

3-Cl-Benzylsulfonyl-dSer-Gly-4-Amidinobenzylamid
3-Cl-Benzylsulfonyl-dSer-Ala-4-Amidinobenzylamid
3-Cl-Benzylsulfonyl-dSer-Pro-4-Amidinobenzylamid
15 3-Cl-Benzylsulfonyl-dSer-Ser-4-Amidinobenzylamid

4-Cl-Benzylsulfonyl-dSer-Ala-4-Amidinobenzylamid
4-Cl-Benzylsulfonyl-dSer-Pro-4-Amidinobenzylamid
4-Cl-Benzylsulfonyl-dSer-Ser-4-Amidinobenzylamid
20

2-Methyl-Benzylsulfonyl-dSer-Gly-4-Amidinobenzylamid
2-Methyl-Benzylsulfonyl-dSer-Ala-4-Amidinobenzylamid
2-Methyl-Benzylsulfonyl-dSer-Pro-4-Amidinobenzylamid
2-Methyl-Benzylsulfonyl-dSer-Ser-4-Amidinobenzylamid

3-Methyl-Benzylsulfonyl-dSer-Gly-4-Amidinobenzylamid

3-Methyl-Benzylsulfonyl-dSer-Ala-4-Amidinobenzylamid

3-Methyl-Benzylsulfonyl-dSer-Pro-4-Amidinobenzylamid

5 3-Methyl-Benzylsulfonyl-dSer-Ser-4-Amidinobenzylamid

4-Methyl-Benzylsulfonyl-dSer-Ala-4-Amidinobenzylamid

4-Methyl-Benzylsulfonyl-dSer-Pro-4-Amidinobenzylamid

4-Methyl-Benzylsulfonyl-dSer-Ser-4-Amidinobenzylamid

10

Einen besonders bevorzugten Hemmstoff von Urokinase mit hoher Affinität, der ebenfalls besonders langsam eliminiert wird, bildet acyliertes 4-Amidinobenzylamin, das als P₁ (P₂) Aminosäure eine natürliche oder künstliche, unsubstituierte oder substituierte basische Aminosäure in der L-Konfiguration, besonders bevorzugt Arginin oder Lysin besitzt, und wenn D-Serin als P₂ (P₃) Rest gebunden ist, und wenn die Verbindung eine N-terminale Schutzgruppe R₅ aus einem Aryl- bzw. Aralkyl-sulfonyl-Rest aufweist.

20 Bei einer starken Inaktivierung von Urokinase werden die zusätzlich geladenen 4-Amidinobenzylamin-Derivate auf vorteilhafte und überraschende Weise sehr langsam eliminiert, so dass die erfindungsgemäßen Verbindungen eine neue Gruppe von hochaktiven Urokinase-Hemmstoffen darstellen.

Beispiele für solche Verbindungen sind neben den bereits genannten:

25

Benzylsulfonyl-dSer-homoLys-4-Amidinobenzylamid

- Benzylsulfonyl-dSer-norArg-4-Amidinobenzylamid
- Benzylsulfonyl-dSer-homoArg-4-Amidinobenzylamid
- Benzylsulfonyl-dSer-Orn-4-Amidinobenzylamid
- Benzylsulfonyl-dSer-Orn(2-Imidazoliny)-4-Amidinobenzylamid
- 5 Benzylsulfonyl-dSer-His-4-Amidinobenzylamid
- Benzylsulfonyl-dSer-Dab-4-Amidinobenzylamid
- Benzylsulfonyl-dSer-4-[(2-Amino)Pyrimidinyl]Buttersäure-4-Amidinobenzylamid
- Benzylsulfonyl-dSer-Dap-4-Amidinobenzylamid
- 10 Benzylsulfonyl-dSer-Ala[3-(2-Pyrrolidiny)]-4-Amidinobenzylamid
- Benzylsulfonyl-dSer-Ala[3-Pyrrolidiny-(2-N-Amidino)]-4-Amidinobenzylamid
- Benzylsulfonyl-dSer-Ala[3-(N-Piperazine-4-N-amidino)]-4-Amidinobenzylamid
- Benzylsulfonyl-dSer-Ala(4-Pip)-4-Amidinobenzylamid
- Benzylsulfonyl-dSer-Ala[4-Pip(N-amidino)]-4-Amidinobenzylamid
- 15 Benzylsulfonyl-dSer-homoAla(4-Pip)-4-Amidinobenzylamid
- Benzylsulfonyl-dSer-Ala[3-Pip(N-amidino)]-4-Amidinobenzylamid
- Benzylsulfonyl-dSer-homoAla(3-Pip)-4-Amidinobenzylamid
- Benzylsulfonyl-dSer-homoAla[4-Pip(N-amidino)]-4-Amidinobenzylamid
- Benzylsulfonyl-dSer-Ala-(3-guanidino)-4-Amidinobenzylamid
- 20 Benzylsulfonyl-dSer-Phe(3-Amidino)-4-Amidinobenzylamid
- Benzylsulfonyl-dSer-Phe(4-Amidino)-4-Amidinobenzylamid
- Benzylsulfonyl-dSer-Phe(3-NH₂)-4-Amidinobenzylamid
- Benzylsulfonyl-dSer-Phe(4-NH₂)-4-Amidinobenzylamid
- Benzylsulfonyl-dSer-Phe(3-Guanidino)-4-Amidinobenzylamid
- 25 Benzylsulfonyl-dSer-Phe(4-Guanidino)-4-Amidinobenzylamid

- Benzylsulfonyl-dSer-Phe[4-(2-imidazoliny)]-4-Amidinobenzylamid
Benzylsulfonyl-dSer-Phe[3-CH₂-(guanidino)]-4-Amidinobenzylamid
Benzylsulfonyl-dSer-Phe[4-CH₂-(guanidino)]-4-Amidinobenzylamid
Benzylsulfonyl-dSer-homoPhe(3-Amidino)-4-Amidinobenzylamid
5 Benzylsulfonyl-dSer-homoPhe(4-Amidino)-4-Amidinobenzylamid
Benzylsulfonyl-dSer-hPhe(3-NH₂)-4-Amidinobenzylamid
Benzylsulfonyl-dSer-hPhe(4-NH₂)-4-Amidinobenzylamid
Benzylsulfonyl-dSer-hPhe(3-Guanidino)-4-Amidinobenzylamid
Benzylsulfonyl-dSer-hPhe(4-Guanidino)-4-Amidinobenzylamid
10
Benzylsulfonyl-dSer-cis-Cha(4-NH₂)-4-Amidinobenzylamid
Benzylsulfonyl-dSer-trans-Cha(4-NH₂)-4-Amidinobenzylamid
Benzylsulfonyl-dSer-cis-homoCha(4-NH₂)-4-Amidinobenzylamid
Benzylsulfonyl-dSer-trans-homoCha(4-NH₂)-4-Amidinobenzylamid
15 Benzylsulfonyl-dSer-trans-Cha(4-CH₂NH₂)-4-Amidinobenzylamid
Benzylsulfonyl-dSer-trans-homoCha(4-CH₂NH₂)-4-Amidinobenzylamid

Die Verbindungen liegen in der Regel als Salze, vorzugsweise mit Mineralsäuren, bevorzugt als Hydrochloride, vor oder vorzugsweise als Salze mit geeigneten
20 organischen Säuren. Bevorzugte Salze von Mineralsäuren sind auch Sulfate. Geeignete organische Säuren sind beispielsweise Essigsäure, Ameisensäure, Methylsulfonsäure, Bernsteinsäure, Apfelsäure oder Trifluoressigsäure, wobei bevorzugte Salze von organischen Säuren Acetate sind.

25 Die Verbindungen der allgemeinen Formel I können in prinzipiell bekannter Weise, wie nachfolgend beschrieben, beispielsweise wie folgt hergestellt werden:

Aus dem kommerziell erhältlichen 4-Cyanobenzylamin (Showa Denko, Japan) wird das Boc-geschützte 4-Acetyloxamidinobenzylamin nach dem Fachmann bekannten Verfahren gewonnen (Judkins et al., Synth. Commun. 26, 4351
5 (1996)). Nach Abspaltung der Boc-Schutzgruppe erfolgt die Ankopplung der weiteren Aminosäuren und der Schutzgruppe R_5 mittels Standardkopplungsmethoden mit Boc als N-terminaler Schutzgruppe. Die P_2 (P_3) Aminosäure kann auch direkt als N-aryl- bzw. N-aralkyl-sulfonyl-geschützte Aminosäure gekoppelt werden. Die Peptidanaloga werden sequentiell, beginnend
10 vom Acetyloxamidinobenzylamin, aufgebaut. Die meisten Zwischenprodukte kristallisieren gut und lassen sich damit einfach reinigen. Die Endreinigung der Hemmstoffe erfolgt auf der letzten Stufe vorzugsweise über präparative, reversed-phase HPLC.

15 Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist auch ein Verfahren zur Herstellung einer Verbindung der allgemeinen Formel I oder II, wobei sequentiell die entsprechenden Aminosäuren an ein 4-Acetyloxamidinobenzylamin angekoppelt werden, wobei die N-terminale Aminosäure entweder den R_5 -Rest bereits trägt oder dieser anschließend daran gebunden wird.

20

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Arzneimittel enthaltend einen erfindungsgemäßen Hemmstoff sowie weitere pharmazeutisch geeignete Hilfs- und/oder Zusatzstoffe. Geeignete Hilfs- und/oder Zusatzstoffe, die z.B. der Stabilisierung und/oder Konservierung des Arzneimittels dienen, sind dem
25 Fachmann allgemein geläufig (z.B. Sucker H. et al., (1991) Pharmazeutische Technologie, 2. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart). Hierzu zählen beispielsweise physiologische Kochsalzlösungen, Ringer-Dextrose, Ringer-Laktat, entmineralisiertes Wasser, Stabilisatoren, Antioxidantien, Komplexbildner, antimikrobielle Verbindungen, Proteinaseinhibitoren und/oder
30 inerte Gase.

Das Arzneimittel könnte beispielsweise in parenteraler Anwendungsform, insbesondere in intraarterieller, intravenöser, intramuskulärer oder subcutaner Form, in enteraler Anwendungsform, insbesondere zur oralen oder rektalen Anwendung, oder in topischer Anwendungsform, insbesondere als Dermatikum, angewendet
5 werden. Bevorzugt sind intravenöse oder subkutane Anwendungen.

In einer Ausführungsform der Erfindung wird das Arzneimittel beispielsweise in Form einer Tablette, eines Dragées, einer Kapsel, eines Pellets, Suppositoriums, einer Lösung, insbesondere einer Injektions- oder Infusionslösung, von Augen-,
10 Nasen und Ohrentropfen, eines Safts, einer Kapsel, einer Emulsion oder Suspension, eines Globuli, Styli, Aerosols, Puders, einer Paste, Creme oder Salbe eingesetzt.

Die erfindungsgemäßen Urokinasehemmstoffe oder die genannten Arzneimittel
15 werden bevorzugt zur Diagnose, Therapie oder Prophylaxe eines Tumors, insbesondere der Reduzierung der Bildung von Tumormetastasen, bevorzugt in oraler, subkutaner, intravenöser oder transdermaler Form verwendet.

Die Erfindung soll nachstehend anhand von 14 Ausführungsbeispielen näher
20 erläutert werden, ohne sie zu beschränken:

Methoden

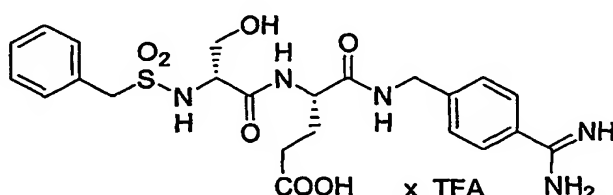
Analytische HPLC: Shimadzu LC-10A System, Säule: Vydac C₁₈, 5 µm (250 x 4 mm) Lösungsmittel A: 0,1 % TFA in Wasser, B: 0,1 % TFA in ACN, Gradient:
25 10 % B bis 60 % B in 50 min, 1 ml/min Fluß, Detektion bei 220 oder 215 nm.

Präparative HPLC: Shimadzu LC-8A System, Säule: Knauer C₁₈, 5 µm (250 x 32 mm) Lösungsmittel A: 0,1 % TFA in Wasser, B: 0,1 % TFA in ACN, Gradient: 10 % B bis 55 % B in 120 min, 10 ml/min Fluß, Detektion bei 220 nm.

Massenspektroskopie: Die Massenspektren wurden auf einem Kompact Probe der Firma Kratos (Manchester, England) mit einem Flugzeitmessungsdetektor und α -Cyano-Hydroxyzimtsäure als Matrix, bzw. auf einem ESI-MS LCQ der Firma Finnigan (Bremen, Deutschland), gemessen.

5

Beispiel 1: Synthese von Benzylsulfonyl-D-Ser-Glu-4-Amidinobenzylamid x TFA



10

1a) Boc-4-Cyanobenzylamid

20 g (0,151 mol) 4-Cyano-benzylamin wurden in 300 ml H₂O, 150 ml Dioxan und 150 ml 1 N NaOH gelöst. Unter Eiskühlung wurden 37,5 ml Di-tert.-butyl-
 15 dicarbonat zugetropft und eine Stunde bei 0 °C sowie weitere 24 Std. bei Raumtemperatur gerührt. Das Dioxan wurde im i.V. entfernt und das Produkt wurde in Essigester und 5 % KHSO₄-Lösung aufgenommen. Die Essigesterphase wurde 3Mal mit 5 %-iger KHSO₄- und 3-mal mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und i.V. eingengt (weiße Kristalle). HPLC:
 20 Acetonitril/H₂O, Elution bei 44,1 % Acetonitril; Ausbeute: 30,48 g (0,131 mol), 87 %.

1b) Boc-4-Acetyloxamidinobenzylamid

Nach Judkins et al. (Synthetic Comm. 26, 4351-4367, 1996) wurden 30,48 g
 25 (0,131 mol) Boc-4-Cyanobenzylamid mit 13,65 g (0,197 mol) Hydroxylamin x HCl und 34 ml (0,197 mol) DIEA in 300 ml abs. Ethanol gelöst. Es wurde 2 Std.

unter Rückfluss gekocht und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Danach wurde der Ansatz i.V. eingengt, der Rückstand in ca. 200 ml Essigsäure gelöst und mit 18,67 ml (0,197 mol) Essigsäureanhydrid versetzt. Nach 1 Std. wurde erneut eingengt, in Essigester gelöst und bei 0 °C je 3-mal mit 5 %iger KHSO₄- und gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Nach dem Trocknen über Na₂SO₄ und Einengen i.V. fiel ein weißes Pulver an. HPLC: Acetonitril/H₂O, Elution bei 32,0 % Acetonitril; Ausbeute: 31,3 g (0,102 mol) 78 %.

1c) 4-Acetyloxamidinobenzylamin x HCl

5 mmol Boc-4-Acetyloxamidinobenzylamid werden in 20 ml 1 N HCl in Eisessig gelöst und 45 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Dann wird i.V. weitgehend eingengt, das Produkt mit trockenem Diethylether gefällt, abgefrittet, nochmals mit frischem Ether gewaschen und i.V. getrocknet. Auf Grund der quantitativen Umsetzung wurde das Produkt ohne weitere Reinigung für den nächsten Syntheseschritt eingesetzt.

1d) Boc-Glu(OBzl)-4-Acetyloxamidinobenzylamid

Die Kopplung von Boc-Glu(OBzl)-OH (Orpegen, Heidelberg) an 4-Acetyloxamidinobenzylamin x HCl erfolgte nach Frérot et al. (Tetrahedron 47, 259 ff., 1991). Dazu wurden 2,27 g (9,3 mmol) 4-Acetyloxamidinobenzylamin x HCl und 3,138 g (9,3 mmol) Boc-Glu(OBzl)-OH in ca. 25 ml DMF gelöst. Bei 0 °C wurden 4,84 g (9,3 mmol) PyBOP und 3,878 ml (27,9 mmol) TEA zugegeben und der pH-Wert mit TEA auf 9 eingestellt. Nach 1 Std. Rühren bei Raumtemperatur wurde i.V. eingengt, in Essigester aufgenommen und je 3-mal sauer, basisch und neutral gewaschen, mit Na₂SO₄ getrocknet und i.V. eingengt. Ausbeute: 4,1 g (7,8 mmol) 84 %.

1e) H-Glu(OBzl)-4-Acetyloxamidinobenzylamid x HCl

4,1 g Boc-Glu(Bzl)-4-Acetyloxamidinobenzylamid wurden in 100 ml 1 N HCl in Eisessig gelöst und 45 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Dann wurde i.V. weitgehend eingeeengt und mit trockenem Diethylether gefällt, danach abgefrittet und das Produkt nochmals mit frischem Ether gewaschen. Nach Trocknen des Produkts i.V. wurde es ohne weitere Aufreinigung für die Synthese nach Punkt 1g) eingesetzt.

1f) Benzylsulfonyl-D-Ser(Bzl)-OH

229 mg (1,173 mmol) H-D-Ser(Bzl)-OH und 408 µl (2,345 mmol) DIEA wurden in 50 ml 50 % Acetonitril gelöst. Dann wurden 335 mg (1,76 mmol) Benzylsulfonylchlorid zugegeben und 12 Std. bei Raumtemperatur gerührt. Es wurde i.V. eingeeengt, mit Essigester aufgenommen und je 3-mal sauer und neutral gewaschen. Nach Trocknen über Natriumsulfat wurde i.V. eingeeengt. Ausbeute: 289 mg (0,827 mmol) 71 %.

15

1g) Benzylsulfonyl-D-Ser(Bzl)-Glu(OBzl)-4-Acetyloxamidinobenzylamid

151 mg (0,433 mmol) Benzylsulfonyl-D-Ser(Bzl)-OH und 194 mg (0,433 mmol) H-Glu(OBzl)-4-Acetyloxamidinobenzylamid x HCl wurden in 5 ml abs. DMF gelöst. Unter Eiskühlung wurden 225 mg (0,433 mmol) PyBOP und 230 µl (1,32 mmol) DIEA zugegeben. Nach 2 Std. wurde i.V. eingeeengt, mit Essigester aufgenommen und je 3-mal sauer, basisch und neutral gewaschen. Nach Trocknen über Natriumsulfat wurde i.V. eingeeengt und ohne weitere Aufarbeitung nach Punkt 1.8 hydriert. Ausbeute: 270 mg (0,364 mmol) 84 %.

1h) Benzylsulfonyl--D-Ser-Glu-4-Amidinobenzylamid x TFA

270 mg (0,364 mmol) Bzls-D-Ser(Bzl)-Glu(OBzl)-4-Acetyloxamidinobenzylamid wurden in 30 ml 90 %iger Essigsäure gelöst. Anschließend wurden unter Argon 20 mg 10 % Palladium auf Aktivkohle zugesetzt. Argon wurde durch eine Wasserstoffatmosphäre ersetzt und der Ansatz unter kräftigem Rühren 24 Std. hydriert. Der Katalysator wurde abfiltriert, das Filtrat i.V. eingengt und das Produkt mit präparativer reversed-phase HPLC gereinigt (Acetonitril/H₂O, 0,1 % Trifluoressigsäure, Elution bei 22,6 % Acetonitril).

10

Beispiel 2: Hemmung von Urokinase durch ausgewählte 4-Amidinobenzylamid-Verbindungen

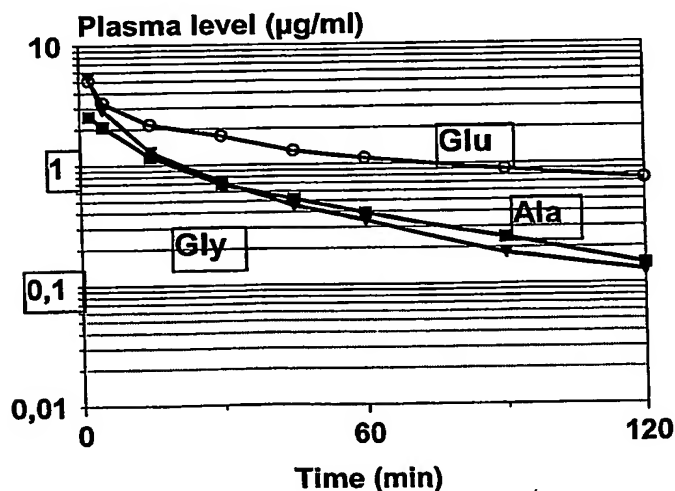
Tabelle 1

R ₅	Konfiguration R ₄	R ₄	R ₃	X-R ₂	Y-R ₁	K _i , µM
Bzl-SO ₂	D	CH ₂ -OH	H	CH ₂	CH ₂	0,036
Bzl-SO ₂	D	CH ₂ -OH	H	CH-CH ₃	CH ₂	0,0077
Bzl-SO ₂	D	CH ₂ -OH	H	CH-CH ₂ -COOH	CH ₂	0,86
Bzl-SO ₂	D	CH ₂ -OH	H	CH-(CH ₂) ₂ -COOH	CH ₂	0,16

Bestimmung der Hemmwirkung

Zur Bestimmung der Hemmwirkung wurden 200 μ l Tris-Puffer (0,05 M, 0,154 M NaCl, 5 % Ethanol, pH 8,0; enthält den Inhibitor), 25 μ l Substrat (Bzl- β Ala-Gly-Arg-pNA in H₂O) und 50 μ l sc-Urokinase bei 25 °C inkubiert. Nach 3 min wurde die Reaktion durch Zugabe von 25 μ l Essigsäure (50%) unterbrochen und die Absorption bei 405 nm mittels Microplate Reader (Dynatech MR 5000) bestimmt. Die K_i-Werte wurden nach Dixon (Biochem. J. 55, 170-171, 1953) durch lineare Regression mittels eines Computerprogramms ermittelt. Die K_i-Werte sind das Mittel aus mindestens drei Bestimmungen.

Beispiel 3: Elimination nach i.v.-Gabe von 1 mg/kg Körpergewicht an der Ratte von Derivaten des Benzylsulfonyl-D-Ser-Gly-4-amidinobenzylamids mit Ala bzw. Glu in P2-Position

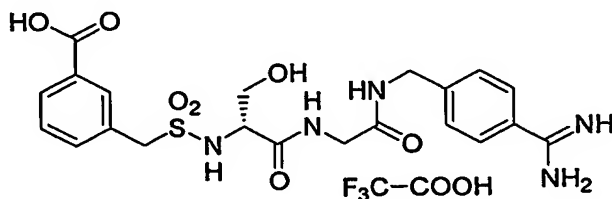


25 Tierversuche

Weibliche Wistar Ratten (240-300 g Körpergewicht) wurden narkotisiert (Ethylurethan 2,5 g/ml in NaCl, 0,5 ml/100 g Ratte), anschließend erfolgte die

Präparation der am Hals gelegenen *A. carotis*. Ein in diesem Gefäß fixierter Katheter ermöglichte die Blutentnahme zu festgelegten Zeiten. Das Applikationsvolumen betrug 0,5 ml, als Applikationslösung wurde 0,9% NaCl eingesetzt. Blutproben à 500 µl (versetzt im Verhältnis 19 + 1 mit 1,04 M Natriumcitrat) wurden zu folgenden Zeitpunkten entnommen: 2, 5, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240 und 270 min. Der entstandene Blutverlust wurde unmittelbar nach Entnahme der Probe mit 500 µl 0,9 % NaCl-Lösung kompensiert. Citratplasma wurde durch Zentrifugation des Blutes bei 1200*g, für 10 min erhalten. Die Konzentration der Wirkstoffe im Plasma wurde mittels HPLC ermittelt.

Beispiel 4: 3-(HOOC)Benzylsulfonyl-dSer-Gly-4-Amidinobenzylamid x TFA



15

4a) 3-(COOMe)-Benzylsulfonsäure Natrium-Salz

5 g (21,1 mmol) 3-(Bromomethyl)Benzoessäuremethylester (Lancaster) wurden in 35 ml Wasser suspendiert und nach Zugabe von 2,94 g (23,3 mmol) Na₂SO₃ 8 h unter Rückfluss gekocht. Der Ansatz wurde heiß filtriert und das Wasser im Vakuum bis zur beginnenden Kristallisation eingengt. Der Ansatz wurde über Nacht im Kühlschrank aufbewahrt, danach wurden die Kristalle abgesaugt und nochmals aus Wasser umkristallisiert. Die Kristalle wurden abgesaugt und im Vakuum getrocknet.

Ausbeute: 3,9 g (15,46 mmol) HPLC: 22,3 % B

25

4b) 3-(COOMe)-Benzylsulfonylchlorid

2,5 g (9,91 mmol) 3-(COOMe)-Benzylsulfonsäure Natrium-Salz wurden mit ca. 10 ml Phosphorylchlorid angefeuchtet, mit 2,27 g (10,9 mmol) PCl_5 versetzt und 15 Minuten im Eisbad gerührt. Danach wurde der Ansatz 4 h auf 80 °C erwärmt.

- 5 Anschließend wurde der Ansatz auf Eis gegossen und 30 min kräftig gerührt, das Produkt schied sich in Form weißer Kristalle auf dem Eis ab. Nachdem das Eis teilweise aufgetaut war, wurde der Ansatz durch eine Fritte filtriert und das verbleibende Produkt-Eis-Gemisch mehrmals mit Wasser gewaschen. Die verbleibenden Kristalle wurden im Vakuum getrocknet.

- 10 Ausbeute: 1,6 g (6,43 mmol) 65 % (weiße Kristalle)

4c) 3-(COOMe)-Benzylsulfonyl-dSer(tBu)-OH

- 0,75 g (4,65 mmol) H-dSer(tBu)-OH (Bachem) wurden in 60 ml trockenem DCM suspendiert, mit 1,23 ml (9,765 mmol) Trimethylsilylchlorid und 1,7 ml (9,765 mmol) DIEA versetzt. Der Ansatz wurde 1,0 h unter Rückfluss gekocht und
15 danach im Eisbad abgekühlt. Anschließend wurden 1,27 g (5,12 mmol) 3-(COOMe)-Benzylsulfonylchlorid und 1,04 ml (6 mmol) DIEA in mehreren Portion innerhalb von 30 min zugegeben. Der Ansatz wurde weitere 15 min unter Eiskühlung und danach für 3 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel
20 wurde im Vakuum entfernt, der Rückstand in Wasser (mit 1 N NaOH auf pH 8,5-9 gebracht) gelöst und 2 x mit Ether extrahiert. Die wässrige Phase wurde mit 5 % KHSO_4 -Lösung angesäuert und 3 x mit Essigester extrahiert. Die vereinte Essigesterphase wurde jeweils 3 x mit 5 % KHSO_4 -Lösung und NaCl-gesättigter Lösung gewaschen und mit Na_2SO_4 getrocknet. Anschließend wurde das
25 Lösungsmittel im Vakuum entfernt.

Ausbeute: 1,3 g (3,48 mmol Feststoff), HPLC: 51 % B

4d) H-Gly-4-Acetyloxamidinobenzylamid x HCl

2 g (5,49 mmol) Boc-Gly-4-Acetyloxamidinobenzylamid (hergestellt wie in WO 01/96286 A2 beschrieben) wurden mit 30 ml 1 N HCl in Eisessig versetzt. Der Ansatz wurde gelegentlich umgeschüttelt. Nach 45 min wurde das Lösungsmittel etwas eingeeengt und das Produkt durch Zugabe von Diethylether gefällt, auf einer
5 Fritte abgesaugt, mit Ether gewaschen und im Vakuum getrocknet.

Ausbeute: 1,55 g (5,15 mmol), weißer Feststoff

4e) 3-(COOMe)-Benzylsulfonyl-dSer(tBu)-Gly-4-Acetyloxamidinobenzylamid

1 g (2,68 mmol) 3-(COOMe)-Benzylsulfonyl-dSer(tBu)-OH und 0,84 g (2,8
10 mmol) H-Gly-4-Acetyloxamidinobenzylamid x HCl wurden unter Rühren und Eiskühlung in 15 ml DMF gelöst und mit 1,39 g (2,68 mmol) PyBop sowie 1,26 ml (7,236 mmol) DIEA versetzt. Nach 30 min wurde das Eisbad entfernt und weitere 4 h bei Raumtemperatur gerührt. Das DMF wurde im Vakuum eingeeengt, der verbleibende Rückstand in Essigester gelöst und jeweils 3 x mit 5 % KHSO₄,
15 NaCl-gesättigtem Wasser, gesättigter NaHCO₃-Lösung und nochmals mit NaCl-gesättigtem Wasser gewaschen. Die Essigesterphase wurde mit Na₂SO₄ getrocknet und anschließend das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde ohne weitere Reinigung für den nächsten Syntheseschritt verwendet.

20 Ausbeute: 1,35 g (2,18 mmol) Öl, HPLC: 47,89 % B

4f) 3-(COOMe)-Benzylsulfonyl-dSer(tBu)-Gly-4-Amidinobenzylamid x Acetat

1 g (1,61 mmol) 3-(COOMe)-Benzylsulfonyl-dSer(tBu)-Gly-4-Acetyloxamidi-
25 nobenzylamid wurden in 65 ml 90 % Essigsäure gelöst, mit 150 mg Katalysator (10 % Pd auf Aktivkohle) versetzt und über Nacht mit Wasserstoff hydriert. Der Katalysator wurde abfiltriert und das Lösungsmittel im Vakuum eingeeengt. Der verbleibende Rückstand wurde mit Toluol versetzt, danach wurde das Lösungsmittel im Vakuum wieder entfernt. Dieser Vorgang wurde nochmals

wiederholt. Der verbleibende Rückstand wurde direkt für den nächsten Reaktionsschritt verwendet.

Ausbeute: 0,9 g (1,44 mmol) Feststoff, HPLC: 39,75 % B

Ca. 50 mg des Rohproduktes wurden mit präparativer reversed-phase HPLC
5 gereinigt und lyophilisiert.

MS: berechnet 561,2 (monoisotopic), gefunden 562,9 $[M+H]^+$

4g) 3-(COOH)-Benzylsulfonyl-dSer(tBu)-Gly-4-Amidinobenzylamid x TFA

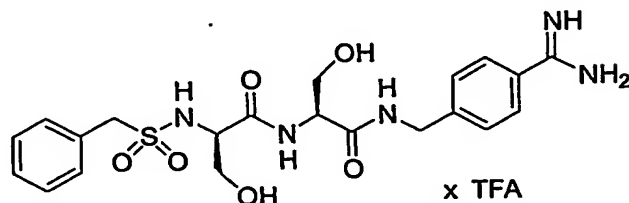
750 mg (1,2 mmol) 3-(COOMe)-Benzylsulfonyl-dSer(tBu)-Gly-4-Amidi-
10 nobenzylamid x Acetat wurden in 20 ml Methanol und 10 ml Wasser gelöst und
mit 4 ml 1 N LiOH versetzt. Der Ansatz wurde über Nacht gerührt, nach ca. 15 h
mit 5 % $KHSO_4$ neutralisiert (pH 6-7) und das Lösungsmittel im Vakuum
entfernt. Das Rohprodukt wurde mittels präparativer reversed-phase HPLC
gereinigt und lyophilisiert.

15 HPLC: 34,16 % B (weißer Feststoff)

4h) 3-(COOH)-Benzylsulfonyl-dSer-Gly-4-Amidinobenzylamid

100 mg (0,151 mmol) 3-(COOH)-Benzylsulfonyl-dSer(tBu)-Gly-4-Amidi-
nobenzylamid wurden mit 0,5 ml Wasser und 4,5 ml Trifluoressigsäure versetzt.
20 Der Ansatz wurde 60 min bei Raumtemperatur belassen und danach das
Lösungsmittel im Vakuum eingeeengt. Der Rückstand wurde in Wasser gelöst und
lyophilisiert.

Ausbeute: 91 mg (weißer Feststoff) HPLC: 23,47 % B

Beispiel 5: Benzylsulfonyl-dSer-Ser-4-Amidinobenzylamid x TFA**5a) Boc-Ser(Bzl)-4-Acetyloxamidinobenzylamid**

- 5 4,847 g (16,41 mmol) Boc-Ser(Bzl)-OH wurden in 50 ml THF gelöst und bei -15 °C mit 1,805 ml (16,41 mmol) NMM und 2,133 ml CKBIE versetzt. Der Ansatz wurde 10 min bei -15 °C gerührt, dann wurden 4 g (16,41 mmol) 4-(Acetyloxamidino)Benzylamin x HCl (hergestellt wie in WO 01/96286 A2 beschrieben) und nochmals 1,805 ml (16,41 mmol) NMM hinzugefügt. Der
- 10 Ansatz wurde eine weitere Stunde bei -15 °C und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt, der Ansatz in Essigester aufgenommen und jeweils 3 x mit 5 % KHSO₄, NaCl-gesättigtem Wasser, gesättigter NaHCO₃-Lösung und nochmals mit NaCl-gesättigtem Wasser gewaschen und mit Na₂SO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum
- 15 entfernt und das Produkt aus Essigester kristallisiert.

Ausbeute: 5,8 g (11,98 mmol) weiße Kristalle, HPLC: 50,78 % B

5b) H-Ser(Bzl)-4-Acetyloxamidinobenzylamid x HCl

- 2 g (4,12 mmol) Boc-Ser(Bzl)-4-Acetyloxamidinobenzylamid wurden mit 30 ml 1
- 20 N HCl in Eisessig versetzt. Nach 45 min Stehen bei Raumtemperatur wurde das Lösungsmittel teilweise eingeeengt und das Produkt durch Zugabe von Diethylether gefällt, abgesaugt und nochmals mit Diethylether gewaschen. Das Produkt wurde im Vakuum getrocknet.

Ausbeute: 1,6 g (3,8 mmol) weißer Feststoff, HPLC: 28,51 % B

5c) Bzls-dSer(tBu)-Ser(Bzl)-4-Acetyloxamidinobenzylamid

0,75 g (2,376 mmol) Bzls-dSer(tBu)-OH und 1 g (2,376 mmol) H-Ser(Bzl)-4-Acetyloxamidinobenzylamid x HCl wurden in 20 ml DMF gelöst und bei 0 °C mit 1,236 g (2,376 mmol) PyBop und 1,033 ml (5,94 mmol) DIEA versetzt. Der Ansatz wurde 30 min bei 0 °C und weitere 4 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt, der Rückstand in Essigester aufgenommen und jeweils 3 x mit 5 % KHSO₄, NaCl-gesättigtem Wasser, gesättigter NaHCO₃-Lösung und nochmals mit NaCl-gesättigtem Wasser gewaschen und anschließend mit Na₂SO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt. Es verblieb ein öliges Rohprodukt, das direkt für den nächsten Syntheseschritt eingesetzt wurde.

Ausbeute: 1,15 g (1,69 mmol) Öl, HPLC: 60,48 % B

5d) Bzls-dSer(tBu)-Ser(Bzl)-4-Amidinobenzylamid x Acetat

1 g (1,467 mmol) Bzls-dSer(tBu)-Ser(Bzl)-4-Acetyloxamidinobenzylamid wurden in 50 ml 90 % Essigsäure gelöst, dazu wurden 150 mg Katalysator (10 % Pd/C) gegeben. Der Ansatz wurde 6 h bei Raumtemperatur und Normaldruck mit Wasserstoff hydriert. Anschließend wurde der Katalysator abfiltriert, das Lösungsmittel im Vakuum eingeeengt und mit Toluol versetzt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt, der Vorgang wurde noch 2 x wiederholt. Der verbleibende Rückstand wurde im Vakuum getrocknet und ohne weitere Reinigung für den nächsten Syntheseschritt eingesetzt.

Ausbeute: 0,9 g (1,316 mmol) Öl, HPLC: 49,91 % B.

5e) Bzls-dSer-Ser-4-Amidinobenzylamid x TFA

0,2 g Rohprodukt an Bzls-dSer(tBu)-Ser(Bzl)-4-Amidinobenzylamid x Acetat wurden unter Eiskühlung mit 5 ml TFA versetzt. Nach 10 min wurden 500 µl Trifluormethansulfonsäure hinzugefügt. Nach weiteren 5 min wurde das Eisbad entfernt und der Ansatz 20 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Das Produkt

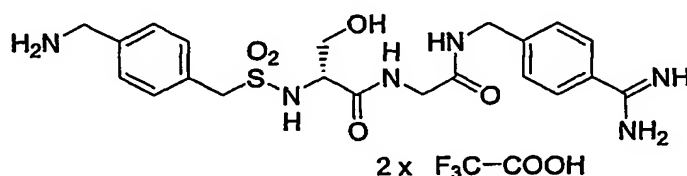
wurde durch Zugabe von Diethylether gefällt und abzentrifugiert. Das Präzipitat wurde nochmals mit Diethylether versetzt, aufgeschüttelt und nochmals zentrifugiert. Das Präzipitat wurde mit präparativer reversed-phase HPLC gereinigt.

5 Ausbeute: 75 mg, HPLC: 24,64 % B

MS: berechnet 477,17 (monoisotopic), gefunden 478,6 $[M+H]^+$

**Beispiel 6: 4-(Aminomethyl)Benzylsulfonyl-dSer-Gly-4-Amidinobenzylamid
x 2 TFA**

10



6a) 4-Cyano-Benzylsulfonsäure Natrium-Salz

30 g (153 mmol) 4-Cyanobenzylbromid (Aldrich) wurden in 150 ml Wasser suspendiert und nach Zugabe von 21,2 g (168,3 mmol) Na₂SO₃ 8 h unter Rückfluß gekocht. Der Ansatz wurde heiß filtriert und das Wasser im Vakuum etwas eingengt. Der Ansatz wurde zur Kristallisation über Nacht im Kühlschrank aufbewahrt, danach wurden die Kristalle abgesaugt und nochmals aus Wasser umkristallisiert. Die Kristalle wurden abgesaugt und im Vakuum getrocknet.

20 Ausbeute: 17,1 g (78 mmol), HPLC: 18,24 % B

6b) 4-Cyano-Benzylsulfonylchlorid

5 g (22,83 mmol) 4-Cyano-Benzylsulfonsäure Natrium-Salz wurden mit ca. 20 ml Phosphorylchlorid angefeuchtet und mit 5,2 g (25,11 mmol) PCl₅ versetzt und 15 min unter Eiskühlung gerührt. Anschließend wurde der Ansatz 4 h auf 80 °C

erwärmt. Danach wurde der Ansatz auf Eis gegossen und 30 min kräftig gerührt, das Produkt schied sich als weißer Feststoff auf dem Eis ab. Nachdem das Eis teilweise aufgetaut war, wurde der Ansatz durch eine Fritte filtriert und das verbleibende Produkt-Eis-Gemisch mehrmals mit Wasser gewaschen. Die
5 verbleibenden Kristalle wurden im Vakuum getrocknet und direkt für den nächsten Syntheseschritt verwendet.

Ausbeute: 3,4 g (15,76 mmol)

6c) 4-Cyano-Benzylsulfonyl-dSer(tBu)-OH

10 1 g (6,2 mmol) H-dSer(tBu)-OH (Bachem) wurden in 50 ml trockenem DCM suspendiert, mit 1,65 ml (13 mmol) Trimethylsilylchlorid und 2,26 ml (13 mmol) DIEA versetzt. Der Ansatz wurde 1 h unter Rückfluß gekocht und im Eisbad abgekühlt. Anschließend wurden 1,47 g (6,82 mmol) 4-Cyano-Benzylsulfonylchlorid und 1,19 ml (6,82 mmol) DIEA innerhalb von 30 min
15 zugesetzt. Der Ansatz wurde weitere 15 min unter Eiskühlung und danach für weitere 3 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt, der Rückstand in Wasser (mit 1 N NaOH auf pH 8,5-9 gebracht) gelöst und 2 x mit Ether extrahiert. Anschließend wurde die wässrige Phase mit 5 % KHSO₄-Lösung angesäuert und 3 x mit Essigester extrahiert. Die vereinte
20 Essigesterphase wurde jeweils 3 x mit 5 % KHSO₄-Lösung und NaCl-gesättigter Lösung gewaschen und mit Na₂SO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt.

Ausbeute: 1,4 g (4,11 mmol Feststoff), HPLC: 48,89 % B

25 6d) 4-Cyano-Benzylsulfonyl-dSer(tBu)-Gly-4-Acetyloxamidinobenzylamid

1 g (2,94 mmol) 4-Cyano-Benzylsulfonyl-dSer(tBu)-OH und 0,884 g (2,94 mmol) H-Gly-4-Acetyloxamidinobenzylamid x HCl (siehe Beispiel 1d) wurden unter Rühren und Eiskühlung in 15 ml DMF gelöst und mit 1,53 g (2,94 mmol) PyBop sowie 1,38 ml (7,94 mmol) DIEA versetzt. Nach 30 min wurde das Eisbad

entfernt und der Ansatz weitere 4 h bei Raumtemperatur gerührt. Das DMF wurde im Vakuum eingengt, der verbleibende Rückstand in Essigester gelöst und jeweils 3 x mit 5 % KHSO₄, NaCl-gesättigtem Wasser, gesättigter NaHCO₃-Lösung und nochmals mit NaCl-gesättigtem Wasser gewaschen und mit Na₂SO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde ohne weitere Reinigung für den nächsten Syntheseschritt verwendet.

Ausbeute: 1,4 g (2,386 mmol) Öl, HPLC: 46,05 % B

6e) 4-Cyano-Benzylsulfonyl-dSer(tBu)-Gly-4-Amidinobenzylamid x Acetat

1 g (1,7 mmol) 4-Cyano-Benzylsulfonyl-dSer(tBu)-Gly-4-Acetyloxamidino-benzylamid wurden in 70 ml 90 % Essigsäure gelöst, mit 150 mg Katalysator (10 % Pd auf Aktivkohle) versetzt und 5 h mit Wasserstoff hydriert. Der Katalysator wurde abfiltriert und das Lösungsmittel eingengt. Der verbleibende Rückstand wurde mit Toluol versetzt, anschließend wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Dieser Vorgang wurde nochmals wiederholt. Der verbleibende Rückstand wurde direkt für den nächsten Reaktionsschritt verwendet.

Ausbeute: 0,85 g (1,44 mmol als Acetat-Salz) Feststoff HPLC: 37,55 % B

Ca. 60 mg dieses Rohproduktes wurden mit präparativer HPLC gereinigt.

MS: berechnet 528,2 (monoisotopic), gefunden 530,1 [M+H]⁺

20

6f) 4-Aminomethyl-Benzylsulfonyl-dSer(tBu)-Gly-4-Amidinobenzylamid x 2 TFA

200 mg Rohprodukt an 4-Cyano-Benzylsulfonyl-dSer(tBu)-Gly-4-Amidinobenzylamid x Acetat wurden in 50 ml 90 % Essigsäure und 5 ml 1 N HCl gelöst, mit 40 mg Katalysator (10 % Pd auf Aktivkohle) versetzt und über Nacht bei 40 °C mit Wasserstoff hydriert. Der Katalysator wurde abfiltriert und das Lösungsmittel im Vakuum eingengt. Der verbleibende Rückstand wurde mit präparativer reversed phase HPLC gereinigt.

Ausbeute: 75 mg (als 2 x TFA-Salz) Feststoff HPLC: 26,05 % B

MS: berechnet 532,25 (monoisotopic), gefunden 533,7 $[M+H]^+$

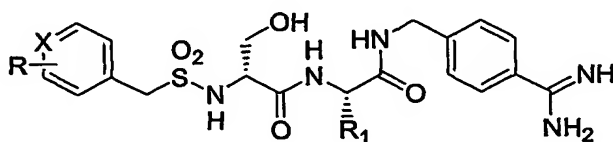
6g) 4-Aminomethyl-Benzylsulfonyl-dSer-Gly-4-Amidinobenzylamid x 2 TFA

- 5 25 mg (0,033 mmol) 4-Aminomethyl-Benzylsulfonyl-dSer(tBu)-Gly-4-Amidinobenzylamid x 2 TFA wurden mit 0,2 ml Wasser und 1,8 ml TFA versetzt. Der Ansatz wurde 60 min bei Raumtemperatur belassen und das Lösungsmittel im Vakuum eingengt. Der Rückstand wurde mit ca. 10 ml Wasser versetzt und lyophilisiert.

- 10 Ausbeute: 20 mg (schwach gelblicher Feststoff) HPLC: 15,4 % B

MS: berechnet 476,18 (monoisotopic), gefunden 477,5 $[M+H]^+$

- Tabelle 2: Hemmkonstanten (K_i in μM) und Halbwertszeiten ($t_{1/2}$ in h) der Elimination (β -Phase) in Ratten nach intravenöser Gabe von 1 mg/kg für Inhibitoren der allgemeinen Struktur. Die Bestimmung der Konstanten Hemmkonstanten (K_i und $t_{1/2}$) erfolgte für uPA wie in Stürzebecher et al., (1997) J Med Chem Vol. 40, 3091-3099 beschrieben und für Plasmin, Trypsin und Thrombin analog hierzu.

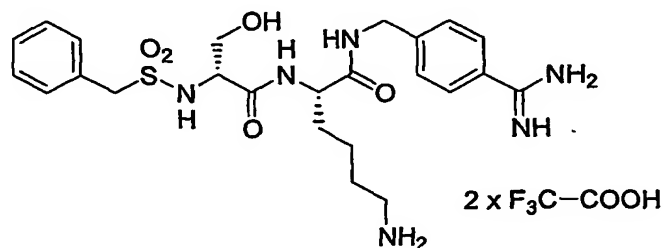


- 20 * n.b. = nicht bestimmt

R	X	R1	K_i (μM)				$t_{1/2}$ (h)
			uPA	Plasmin	Trypsin	Thrombin	
H	CH	H	0,036	11	0,15	13	0,29
3-COOMe	CH	H	0,12	28	0,29	42	n.b.*
3-COOH	CH	H	0,16	59	0,72	150	1,3
4-COOMe	CH	H	0,62	17	0,18	9,4	n.b.
4-COOH	CH	H	0,15	35	0,48	170	2,0
2-COOMe	CH	H	0,083	38	0,40	4,0	n.b.

2-COOH	CH	H	0,37	220	2,4	56	n.b.
4-COOH	CH	CH ₃	0,038	3,0	0,013	2,3	0,66
3-COOH	CH	CH ₃	0,030	4,7	0,021	8,3	0,42
4-CN	CH	CH	0,089	27	0,34	8,5	n.b.
4-(NH ₂ -CH ₂)	CH	H	0,12	7,4	0,28	8,0	n.b.
H	CH	CH ₂ -OH	0,025	0,75	0,022	14	0,50
H	CH	CH ₂ -O(Bzl)	0,028	0,27	0,0068	0,48	n.b.
H	CH	CH ₂ -NH ₂	0,036	0,81	0,021	0,78	0,40
H	CH	CH(OH)CH ₃	0,11	1,4	0,03	4,0	n.b.
H	CH	CH(OBzl)CH ₃	0,061	1,1	0,011	0,10	n.b.
3-COOH	CH	CH ₂ -OH	0,075	4,2	0,058	200	0,43
4-COOH	CH	CH ₂ -OH	0,23	6,2	0,10	120	0,43
4-COOMe	CH	CH ₂ -OH	0,23	0,96	0,020	4,2	n.b.
4-Cl	CH	H	0,032	32	0,35	7,9	n.b.
4-Me	CH	H	0,058	18	0,21	8,0	n.b.
4-F	CH	H	0,031	20	0,11	7,9	n.b.
3,4-Di-Cl	CH	H	0,11	32	0,60	8,3	n.b.
H	N	H	0,10	37	0,41	1,6	n.b.

Beispiel 7: Benzylsulfonyl-dSer-Lys-4-Amidinobenzylamid x 2 TFA



5

7a) Boc-Lys(Tfa)-4-Acetyloxamidinobenzylamid

5 g (14,61 mmol) Boc-Lys(Tfa)-OH wurden in 100 ml THF gelöst und bei -15 °C mit 1,767 ml (16,10 mmol) NMM und 1,899 ml (14,61 mmol) CKIBE versetzt.

- 10 Der Ansatz wurde 10 min bei -15°C gerührt, dann wurden 3,74 g (15,33 mmol) 4-(Acetyloxamidino)Benzylamin x HCl (hergestellt wie in WO 01/96286 A2 beschrieben) und nochmals 1,767 ml (16,10 mmol) NMM hinzugefügt. Der Ansatz wurde eine weitere Stunde bei -15 °C und über Nacht bei Raumtemperatur

gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt, der Ansatz in Essigester aufgenommen und jeweils 3 x mit 5 % KHSO_4 , NaCl-gesättigtem Wasser, gesättigter NaHCO_3 -Lösung und nochmals mit NaCl-gesättigtem Wasser gewaschen und mit Na_2SO_4 getrocknet. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und das Produkt aus Essigester kristallisiert.

Ausbeute: 6,82 g (12,83 mmol) weiße Kristalle, HPLC: 43,87 % B

7b) H-Lys(Tfa)-4-Acetyloxamidinobenzylamid x HCl

5 g (9,41 mmol) Boc-Lys(Tfa)-4-Acetyloxamidinobenzylamid wurden in wenig Eisessig angelöst und anschliessend mit 100 ml 1 N HCl in Eisessig versetzt. Nach 45 min Stehen bei Raumtemperatur wurde das Lösungsmittel teilweise eingeeengt und das Produkt durch Zugabe von Diethylether gefällt, abgesaugt und nochmals mit Diethylether gewaschen. Das Produkt wurde im Vakuum getrocknet.

Ausbeute: 4,65 g (10,78 mmol) weißer Feststoff, HPLC: 25,52 % B

7c) Bzls-dSer(tBu)-Lys(Tfa)-4-Acetyloxamidinobenzylamid

1,93 g (6,107 mmol) Bzls-dSer(tBu)-OH und 3 g (6,412 mmol) H-Lys(Tfa)-4-Acetyloxamidinobenzylamid x HCl wurden in 30 ml Acetonitril gelöst und bei 0 °C mit 3,337 g (6,412 mmol) PyBop und 3,187 ml (18,32 mmol) DIEA versetzt. Der Ansatz wurde 30 min bei 0 °C und weitere 4 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt, der Rückstand in Essigester aufgenommen und jeweils 3 x mit 5 % KHSO_4 , NaCl-gesättigtem Wasser, gesättigter NaHCO_3 -Lösung und nochmals mit NaCl-gesättigtem Wasser gewaschen und anschließend mit Na_2SO_4 getrocknet. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt. Es verblieb ein leicht gelbes, amorphes Rohprodukt, das ohne weitere Reinigung direkt für den nächsten Syntheseschritt eingesetzt wurde.

Ausbeute: 5,88 g (Rohprodukt), HPLC: 52,93 % B

7d) Bzls-dSer(tBu)-Lys(Tfa)-4-Amidinobenzylamid x Acetat

5,88 g (Rohprodukt) Bzls-dSer(tBu)-Lys(Tfa)-4-(Acetyloxamidino) Benzylamid wurden in 150 ml 90 % Essigsäure gelöst, dazu wurden 500 mg Katalysator (10 % Pd/C) gegeben. Der Ansatz wurde 6 h bei Raumtemperatur und Normaldruck mit Wasserstoff hydriert. Anschließend wurde der Katalysator abfiltriert, das Lösungsmittel teilweise eingengt und das Produkt durch Zugabe von Diethylether gefällt, abgesaugt und nochmals mit Diethylether gewaschen. Der weisse, kristalline Niederschlag wurde im Vakuum getrocknet.

Ausbeute: 4,36 g (5,962 mmol), HPLC: 43,50 % B.

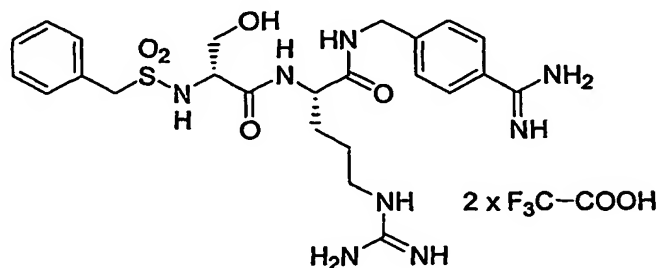
10

7e) Bzls-dSer-Lys-4-Amidinobenzylamid x 2 TFA

0,2 g Rohprodukt an Bzls-dSer(tBu)-Lys(Tfa)-4-Amidinobenzylamid x Acetat wurden unter Eiskühlung mit 5 ml 1M wässriger Piperidinlösung versetzt und 3 h gerührt. Anschliessend wurden 45 ml TFA zugegeben. Nach 1 h Rühren bei Raumtemperatur wurde das Lösungsmittel im Vakuum eingengt, mit Toluol versetzt und das Lösungsmittel erneut im Vakuum entfernt. Dieser Vorgang wurde noch 2 x wiederholt. Der verbleibende Rückstand wurde im Vakuum getrocknet und ohne weitere Reinigung mit präparativer reversed-phase HPLC gereinigt.

20 Ausbeute: 65 mg, HPLC: 21,19 % B

MS: berechnet 574,26 (monoisotopic), gefunden 574,3 [M+H]⁺

Beispiel 8: Benzylsulfonyl-dSer-Arg-4-Amidinobenzylamid x 2 TFA5 8a) Boc-Arg(Boc)₂-4-Acetyloxamidinobenzylamid

0,5 g (1,05 mmol) Boc-Arg(Boc)₂-OH wurden in 25 ml THF gelöst und bei -15 °C mit 122 µl (1,11 mmol) NMM und 137 µl (1,05 mmol) CKIBE versetzt. Der Ansatz wurde 10 min bei -15 °C gerührt, dann wurden 0,274 g (1,11 mmol) 4-(Acetyloxamidino)Benzylamin x HCl (hergestellt wie in WO 01/96286 A2 beschrieben) und nochmals 122 µl (1,11 mmol) NMM hinzugefügt. Der Ansatz wurde eine weitere Stunde bei -15 °C und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt, der Ansatz in Essigester aufgenommen und jeweils 3 x mit 5 % KHSO₄, NaCl-gesättigtem Wasser, gesättigter NaHCO₃-Lösung und nochmals mit NaCl-gesättigtem Wasser gewaschen und mit Na₂SO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt, wobei das Produkt als weisse, amorphe Substanz anfiel.

Ausbeute: 0,654 g (0,985 mmol), HPLC: 48,89 % B

8b) H-Arg-4-Acetyloxamidinobenzylamid x HCl

0,65 g (0,979 mmol) Boc-Arg(Boc)₂-4-Acetyloxamidinobenzylamid wurden in wenig Eisessig angelöst und anschliessend mit 100 ml 1 N HCl in Eisessig versetzt. Nach 45 min Stehen bei Raumtemperatur wurde das Lösungsmittel teilweise eingeeengt und das Produkt durch Zugabe von Diethylether gefällt, abgesaugt und nochmals mit Diethylether gewaschen. Das Produkt wurde im Vakuum getrocknet.

Ausbeute: 0,459 g (0,971 mmol) weißer Feststoff, HPLC: 17,01 % B

8c) Bzls-dSer(tBu)-Arg-4-(Acetyloxamidino)Benzylamid

0,2 g (0,634 mmol) Bzls-dSer(tBu)-OH und 0,3 g (0,634 mmol) H-Arg-4-Acetyloxamidinobenzylamid x HCl wurden in 30 ml DMF gelöst und bei 0 °C mit 0,33 g (0,634 mmol) PyBop und 331 µl (1,902 mmol) DIEA versetzt. Der Ansatz wurde 30 min bei 0 °C und weitere 4 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt, der Rückstand in Essigester aufgenommen und jeweils 2 x mit 5 % KHSO₄, mit NaCl-gesättigtem Wasser gewaschen und anschließend mit Na₂SO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt. Es verblieb ein leicht gelbes Öl, das direkt für den nächsten Syntheseschritt eingesetzt wurde.

Ausbeute: 0,724 g (Öl), HPLC: 38,88 % B

8d) Bzls-dSer(tBu)-Arg-4-Amidinobenzylamid x 2 Acetat

0,724 g (Rohprodukt) Bzls-dSer(tBu)-Arg-4-Acetyloxamidinobenzylamid wurden in 30 ml 90 % Essigsäure gelöst, dazu wurden 100 mg Katalysator (10 % Pd/C) gegeben. Der Ansatz wurde 6 h bei Raumtemperatur und Normaldruck mit Wasserstoff hydriert. Anschließend wurde der Katalysator abfiltriert, das Lösungsmittel teilweise eingeeengt und das Produkt durch Zugabe von Diethylether gefällt, abgesaugt und nochmals mit Diethylether gewaschen. Der weisse, kristalline Niederschlag wurde im Vakuum getrocknet.

Ausbeute: 0,367 g (0,508 mmol), HPLC: 31,66 % B.

8e) Bzls-dSer-Arg-4-Amidinobenzylamid x 2 TFA

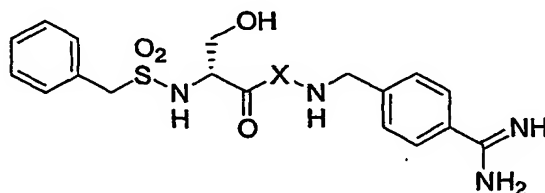
140 mg (0,194 mmol) Benzylsulfonyl-dSer(tBu)-Gly-4-Amidinobenzylamid x 2 AcOH wurden mit 5 ml 90 % TFA versetzt. Der Ansatz wurde 60 min bei Raumtemperatur belassen, anschliessend das Lösungsmittel teilweise eingeeengt

und das Produkt durch Zugabe von Diethylether gefällt, abgesaugt und nochmals mit Diethylether gewaschen. Der weisse, kristalline Niederschlag wurde im Vakuum getrocknet und mit präparativer reversed-phase HPLC gereinigt.

Ausbeute: 74 mg (0,055 mmol) HPLC: 22,15 % B

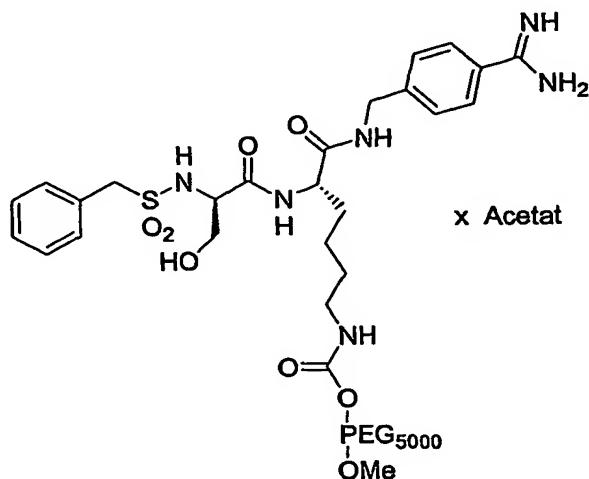
5 MS: berechnet 546,65 (monoisotopic), gefunden 547,34 $[M+H]^+$

Tabelle 3: Hemmkonstanten (K_i in μM) und Halbwertszeiten ($t_{1/2}$ in h) der Elimination (β -Phase) in Ratten nach intravenöser Gabe von 1 mg/kg für Inhibitoren der allgemeinen Struktur. Die Bestimmung der Konstanten Hemmkonstanten (K_i und $t_{1/2}$) erfolgte für uPA wie in Stürzebecher et al.,
 10 (1997) Vol. 40, 3091-3099 beschrieben und für Plasmin, Trypsin und Thrombin analog hierzu.



X	K_i (μM)				$t_{1/2}$ (h)
	uPA	Plasmin	Trypsin	Thrombin	
Lys	0,024	0,36	0,0068	4,3	0,7
Arg	0,0089	0,2	0,007	4,7	0,6

**Beispiel 9: Benzylsulfonyl-dSer-Lys(CO-O-PEG5000-OMe)-4-
Amidinobenzylamid x Acetat**



5

224 mg (0,3 mmol) Benzylsulfonyl-dSer-Lys-4-Amidinobenzylamid x 2 TFA wurden in 20 ml DMF gelöst und bei Raumtemperatur mit 1 g (0,2 mmol) Methoxypolyethylenglykol-p-Nitrophenylcarbonate (Molekulargewicht 5000 Da, Sigma) und 52 µl (0,3 mmol) DIEA versetzt. Nach 1 h wurden nochmals 20 µl

10 DIEA hinzugegeben. Nach 4 h wurde das DMF im Vakuum entfernt, der Rückstand in wenig Methanol gelöst und mit einem großen Volumen an Isopropanol versetzt und im Eis aufbewahrt. Das ausgefallene Produkt wurde abgesaugt und auf der Fritte mit reichlich Isopropanol und anschließend noch mit Diethylether gewaschen. Das Rohprodukt (ca. 1 g) wurde im Vakuum getrocknet

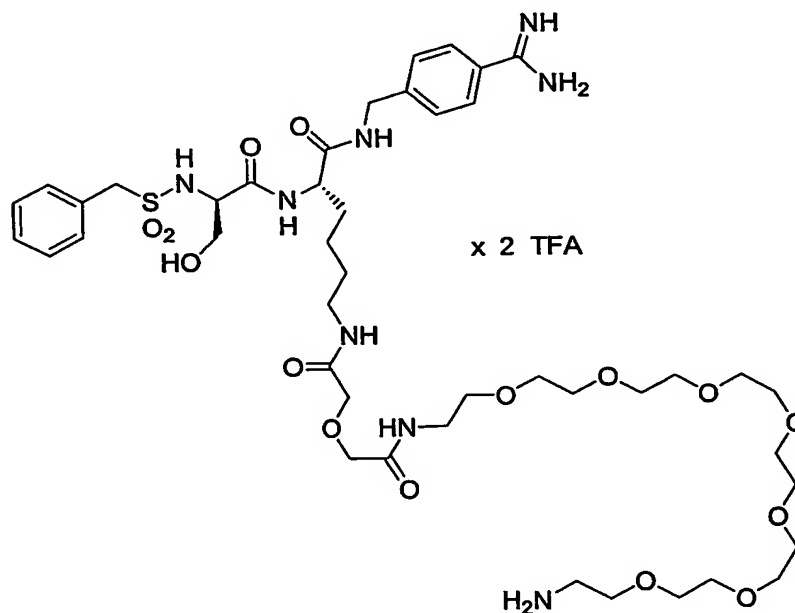
15 und mit einem Ionenaustauscher gereinigt. Dazu wurde das Rohprodukt in Wasser gelöst und auf eine Säule (5 cm x 20 cm, Fractogel EMD COO-, equilibriert mit Wasser) aufgetragen. Zuerst wurde die Säule mit 1000 ml Wasser gewaschen und danach das Produkt mit 2 mM Ammoniumacetat-Lösung eluiert. Die Produkt-

20 enthaltenden Fraktionen (HPLC-Kontrolle, Elution bei 44,96 % B) wurden vereint und das Wasser teilweise eingengt. Das Produkt wurde insgesamt 3 x aus Wasser lyophilisiert.

Ausbeute: 590 mg, HPLC: 44,96 % B

K_i (μM)				$t_{1/2}$ (h)
uPA	Plasmin	Trypsin	Thrombin	
0,095	0,73	0,034	1,7	1,2

Beispiel 10: Bzls-dSer-Lys(CO-CH₂-O-CH₂-CO-NH-CH₂-CH₂-
 5 Hexaethylen-glycol-CH₂-CH₂-NH₂)-4-Amidinobenzylamid x 2
 TFA



0,392 g (ca. 0,478 mmol) Rohprodukt an Bzls-dSer-Lys-4-bAmidinobenzylamid x
 10 2 TFMSA und 280 mg (0,478 mmol) O-(N-Boc-2-Aminoethyl)-O'-(N-Diglycolyl)-2-Aminoethyl)-Hexaethylenglycol (Novabiochem) wurden in 15 ml DMF gelöst. Unter Eiskühlung wurden 0,249 g (0,478 mmol) PyBop und 250 μl (1,434 mmol) DIEA hinzugegeben. Der Ansatz wurde 15 min unter Eiskühlung und weitere 4 h bei Raumtemperatur gerührt. Danach wurde das Lösungsmittel im
 15 Vakuum eingengt und der Rückstand mit 2 ml Wasser und 18 ml TFA versetzt. Der Ansatz wurde 1 h bei Raumtemperatur gerührt und danach das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde mit Toluol versetzt und das

Lösungsmittel wieder im Vakuum entfernt. Dieser Vorgang wurde nochmals wiederholt. Der Rückstand wurde in wenig Methanol angelöst und das Produkt durch Zugabe von Diethylether gefällt, abgesaugt und mit präparativer HPLC gereinigt.

5

Ausbeute: 245 mg, HPLC: 26,87 % B

MS: berechnet 984,48 (monoisotopic), gefunden 985,6 [M+H]⁺

K _i (μM)				t _{1/2} (h)
uPA	Plasmin	Trypsin	Thrombin	
0,042	0,53	0,0047	1,4	0,88

10

Beispiel 11: Benzylsulfonyl-dDap-Gly-4-Amba

Die Verbindung wird unter Anwendung der dem Fachmann bekannten Standardmethoden synthetisiert. Die Hemmkonstanten sind wie folgt:

K _i (μM)				t _{1/2} (h)
uPA	Plasmin	Trypsin	Thrombin	
0,18	9,6	0,18	10	n.b.

15

Beispiel 12: Benzylsulfonyl-dSer-His-4-Amba

Die Verbindung wird unter Anwendung der dem Fachmann bekannten Standardmethoden synthetisiert. Die Hemmkonstanten sind wie folgt:

K _i (μM)				t _{1/2} (h)
uPA	Plasmin	Trypsin	Thrombin	
0,11	0,40	0,025	8,5	n.b.

20

Beispiel 13: 4(HOOC-CH₂)Benzylsulfonyl-dSer-Gly-4-Amba

Die Verbindung wird unter Anwendung der dem Fachmann bekannten Standardmethoden synthetisiert. Die Hemmkonstanten sind wie folgt:

K _i (μM)				t _{1/2} (h)
uPA	Plasmin	Trypsin	Thrombin	
0,13	27	0,3	60	n.b.

5

Beispiel 14: Hemmung der Metastasierung im Tiermodell

Der Einfluß des Inhibitors Benzylsulfonyl-dSer-Ser-4-Amidinobenzylamid auf die Metastasierung wurde an weiblichen Mäusen (Stamm CD1 nu/nu, ca. 25 g Körpergewicht, Charles River, Sulzfeld) untersucht. Den Mäusen wurden 106 Zellen einer lacZ-markierten menschlichen Fibrosarkom-Zelllinie (HT1080 AN PKZ12 K15-1, gelöst in 200 μl PBS) i.v. appliziert (Krüger et al., Cancer Metastasis Rev. 1998-99, 17, 285-294 und Krüger et al., Oncogene 1998, 16, 2419-2423). Die Mäuse der behandelten Gruppe (n = 17) erhielten ab dem Tag -1 (ein Tag vor der Tumorzell-Inokulation) bis zum 21. Tag danach (insgesamt 23 Tage) täglich 2 i.p.-Gaben (je 1,5 mg/kg) des Inhibitors. Die Mäuse der Kontrollgruppe (n = 10) erhielten entsprechend 200 μl Pyrogen-freies Wasser mit 5 % (v/v) Ethanol. Am Tag 22 wurden die Mäuse getötet, die Lungen wurden in 2 % Formalin und 0,2 % Glutaraldehyd fixiert, danach wurden die Lungen mit X-Gal (5-Br-4-Cl-3-Indolyl-β-D-Galaktosid) angefärbt und die Anzahl der Lungenmetastasen bestimmt.

Ergebnis: Die Anzahl der Lungenmetastasen in der mit dem Inhibitor Benzylsulfonyl-dSer-Ser-4-Amidinobenzylamid behandelten Gruppe wurde im Vergleich zur Kontrollgruppe (100 %) auf 4,6 % reduziert.

Verwendete Abkürzungen:

	Ac	Acetyl
	Boc	tert.-Butyloxycarbonyl
	Bzl	Benzyl
5	Bzls	Benzylsulfonyl
	CKIBE	Chlorkohlensäureisobutylester
	Dab	α,γ -Diaminobuttersäure
	Dap	α,β -Diaminopropionsäure
	DIEA	Diisopropylethylamin
10	DMF	N,N-Dimethylformamid
	dSer	D-Serin
	iBu	iso-butyl
	i.V.	im Vakuum
	n.b.	nicht bestimmt
15	NMM	N-Methylmorpholin
	PyBOP	Benzotriazol-1-yl-N-oxy-tris(pyrrolidino)phosphoniumhexafluoro- phosphat
	TEA	Triethylamin
	TFA	Trifluoressigsäure
20	Tfa	Trifluoracetyl
	TFMSA	Trifluormethansulfonsäure
	THF	Tetrahydrofuran

Patentansprüche

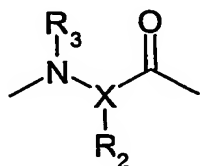
1. Verbindung der allgemeinen Formel I

5



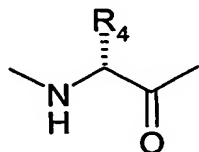
wobei

10

A $P_2 - P_1$ mit $P_1 =$ 

15

und

 $P_2 =$ 

20

ist;

R_1 H oder $-(CH_2)_aCOOR_6$ mit $a = 0, 1, 2, 3, 4$ oder 5 , vorzugsweise mit $a = 0, 1$ oder 2 , ist, wobei R_6 ein verzweigter oder unverzweigter Alkylrest mit vorzugsweise 1 bis 6 C-Atomen, insbesondere 1 bis 3 C-Atomen, vor allem Ethyl, ist;

25

R_2 ein H, ein verzweigter oder unverzweigter Alkylrest mit 1 bis 8 C-Atomen vorzugsweise mit 1 bis 3 C-Atomen, oder $-(CH_2)_cCOOR_8$ mit $c = 1, 2, 3$ oder 4 , wobei R_8 H oder ein verzweigter oder unverzweigter Alkylrest mit vorzugsweise 1 bis 6 C-Atomen, insbesondere 1 bis 3 C-Atomen, vor allem Ethyl, ist oder $-(CH_2)_dOR_9$ mit $d = 1, 2, 3$ oder 4 , wobei R_9 H ist, oder

30

$-(CH_2)_eR_{10}$, $-(CH_2)_eOR_{10}$, $-(CH_2)_eSR_{10}$, $-(CH_2)_e$ -Guanidino,
 $-(CH_2)_e$ -Imidazol oder $-(CH_2)_eNHR_{10}$ mit $e = 1, 2, 3, 4$ oder 5 ist,
 wobei R_{10} H, ein verzweigter oder unverzweigter Alkylrest mit 1-16,
 insbesondere 1-8, vor allem 1-3 C-Atomen oder ein substituierter oder
 unsubstituierter Aryl-, Heteroaryl-, Aralkyl- oder Heteroaralkylrest ist,
 wobei der Alkylrest vorzugsweise 1 bis 16, insbesondere 1 bis 8, vor
 allem 1 bis 3 C-Atome, und der Aryl- oder Heteroarylrest
 vorzugsweise 4 bis 14, insbesondere 6 bis 10, vor allem 6 C-Atome
 und vorzugsweise 1 bis 3 N als Heteroatom besitzt, oder
 $-(CH_2)_kO-CO-OR_{16}$ mit $k = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7$ oder 8 ist, wobei R_{16} ein
 verzweigtes oder unverzweigtes Alkyl mit 1-16, vorzugsweise 1-8,
 insbesondere 1-4, vor allem 1-2 C-Atomen, ein substituierter oder un-
 substituierter Aryl-, Heteroaryl-, Aralkyl- oder Heteroaralkylrest, ein
 Adamantyl-, ein Campher-, ein Cyclohexylmethylrest, vorzugsweise
 Benzyl, ist;

R_3 H oder $-(CH_2)_bR_7$ mit $b = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7$ oder 8 , vorzugsweise mit b
 $= 2$ oder 3 , ist, wobei R_7 H, ein verzweigter oder unverzweigter Alkyl-
 rest mit 1 bis 10 C-Atomen, vorzugsweise mit 1 bis 3 C-Atomen, oder
 ein geladener Rest, vorzugsweise eine $-(CH_2)_jCOOR_{13}$,
 $-(CH_2)_jSO_2R_{13}$, $-(CH_2)_jNH_2$, $-(CH_2)_j$ -Amidino-, $-(CH_2)_j$ -Hydroxy-
 amidino- oder $-(CH_2)_j$ -Guanidinogruppe mit $j = 0, 1$ oder 2 ist, wobei
 R_{13} H oder ein Alkylrest mit vorzugsweise 1 bis 6 C-Atomen,
 insbesondere 1 bis 4, vor allem Ethyl, ist und wobei P_1 in der Struktur
 A in der L-Konfiguration vorliegt;

R_4 ein verzweigter oder unverzweigter Alkylrest mit 1 bis 8, vorzugs-
 weise 1 bis 3, C-Atomen, $-(CH_2)_fOR_{11}$, $-(CH_2)_fSR_{11}$, oder
 $-(CH_2)_fNHR_{11}$ mit $f = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7$ oder 8 ist, wobei R_{11} H oder
 $-CO-OR_{17}$ ist, wobei R_{17} ein verzweigtes oder unverzweigtes Alkyl
 mit 1-16, vorzugsweise 1-8, insbesondere 1-4, vor allem 1-2 C-
 Atomen, ein substituierter oder unsubstituierter Aryl-, Heteroaryl-,

Aralkyl- oder Heteroaralkylrest, ein Adamantyl-, ein Campher-, ein Cyclohexylmethylrest, vorzugsweise Benzyl, ist und wobei P_2 in der Struktur A in der D-Konfiguration vorliegt;

5 R_5 $-(CH_2)_g(CH_3)_h$, $-(CH_2)_i$ -Aryl mit $g + h = i = 0, 1, 2$ oder 3, $-SO_2R_{12}$, $-COR_{12}$, oder $-COOR_{12}$ ist, wobei R_{12} ein verzweigtes oder unverzweigtes Alkyl mit 1-16, vorzugsweise 1 bis 8, insbesondere 1 bis 4, vor allem 1 bis 2 C-Atomen, ein substituierter oder unsubstituierter Aryl-, Heteroaryl-, Aralkyl- oder Heteroaralkylrest, ein Adamantyl-,
 10 ein Campher-, ein Cyclohexylmethylrest, vorzugsweise Benzyl, ist; wobei R_5 mit einer geladenen oder ungeladenen Gruppe, vorzugsweise einer $-(CH_2)_jCOOR_{13}$, $-(CH_2)_jSO_2R_{13}$, $-(CH_2)_jNH_2$, $-(CH_2)_j$ -Amidino-, $-(CH_2)_j$ -Hydroxyamidino- oder $-(CH_2)_j$ -Guanidino-Gruppe mit $j = 0, 1$ oder 2 modifiziert sein kann, wobei R_{13} H oder ein
 15 Alkylrest mit vorzugsweise 1 bis 6 C-Atomen, insbesondere Ethyl, ist;

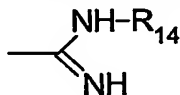
U ein Phenyl- oder Cyclohexylrest ist oder ein Heterophenyl- oder Heterocyclohexylrest mit vorzugsweise mindestens einem N, S oder O als Heteroatom, insbesondere Pyridin, Piperidin oder Pyrimidin, ist;

20 V $(CH_2)_n$ mit $n = 0, 1, 2$ oder 3, vorzugsweise 0, ist;

X N oder CH, vorzugsweise CH, ist;

Y N oder $(CH)_m$ mit $m = 0$ oder 1, vorzugsweise CH, ist;

25 Z in 3- oder 4-Position vorkommt und eine Aminomethyl-, eine Guanidino- oder eine Amidinogruppe



30 ist, wobei R_{14} H, OH, NH_2 , $-COR_{15}$ oder $-COOR_{15}$ ist, wobei R_{15} ein verzweigter oder unverzweigter Alkylrest mit 1 bis 16, vorzugsweise 1 bis 8, insbesondere 1 bis 4, vor allem 1 bis 2 C-Atomen oder ein substituierter oder unsubstituierter Aryl- oder Heteroaryl-, Aralkyl- oder Heteroaralkyl-

rest ist, wobei der Alkylrest vorzugsweise 1 bis 16, insbesondere 1 bis 8, vor allem 1 bis 4 und besonders bevorzugt 1 bis 2 C-Atome und der Aryl- oder Heteroarylrest vorzugsweise 4 bis 14, insbesondere 6 bis 10, vor allem 6 C-Atome und vorzugsweise 1 bis 3 N als Heteroatom besitzt;

5

dadurch gekennzeichnet, dass ein oder mehrere geladene Reste vorzugsweise abgeleitet von $-\text{COOH}$, $-\text{CH}(\text{COOH})_2$, $-\text{SO}_2\text{H}$, NH_2 , einer Amidino-, Hydroxyamidino-, Amidrazono- oder Guanidinogruppe in den Resten R_1 , R_2 , R_3 oder R_5 vorhanden sind;

10

oder eine Verbindung der allgemeinen Formel I in Form eines Prodrugs oder in Form ihres Salzes.

15

2. Verbindung nach Anspruch 1, wobei zusätzlich eine mit einer Amino- oder Carboxylgruppe funktionalisierte Oligo- oder Polyalkylenglycolkette, insbesondere eine Poly- oder Oligoethylenglycol- oder Poly- oder Oligopropylenglycolkette direkt an eine funktionelle Gruppe von R_2 insbesondere über eine $-\text{NH}-$ oder eine $-\text{CO}-$ Gruppe unter Ausbildung einer Amidbindung an R_2 gekoppelt ist, wobei die Oligo- oder Polyalkylenglycolkette zumindest an beiden Enden eine funktionelle Gruppe, insbesondere eine substituierte oder unsubstituierte Amino- und/oder Carboxylgruppe aufweist, oder wobei die Oligo- oder Polyalkylenglycolkette zumindest an einem Ende eine funktionelle Gruppe, insbesondere eine substituierte oder unsubstituierte Amino- und/oder Carboxylgruppe aufweist und am anderen Ende als Alkylether mit 1-4 C-Atomen, insbesondere als Methylether vorliegt, wobei R_2 vorzugsweise

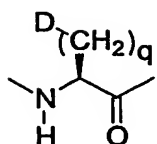
20

25

- (a) $-(\text{CH}_2)_n-\text{NH}_2$ mit n gleich 1-5, vorzugsweise 4 oder
- (b) $-(\text{CH}_2)_n-\text{COOH}$ mit n gleich 1-5, vorzugsweise 1-3 ist.

30

3. Verbindung nach Anspruch 1 oder 2, wobei P_1 nach Kopplung des Oligo- oder Polyalkylenglykols die allgemeine Formel II aufweist



(II),

wobei q gleich 0, 1, 2, 3, 4 oder 5 ist und D gleich Formel III ist

5 E—F—G— (III),

wobei

wenn E gleich eine H₂N-, HOOC-(CH₂)_n-CO-NH-, HOOC- oder H₂N-(CH₂)_n-NH-CO-Gruppe ist, F gleich ein Oligo- oder Polyalkylenglycol der allgemeinen Formel -(CH₂)_d-[O-CH₂-CH₂]_vO-(CH₂)_m-(NH-CO-CH₂-O-CH₂)_k oder -(CH₂)_d-[O-CH(CH₃)-CH₂]_vO-(CH₂)_m-(NH-CO-CH₂-O-CH₂)_k mit d = 1, 2, 3 oder 4, v = eine ganze Zahl von 1 bis 1000, bevorzugt 1 bis 250, m = 0, 1, 2, 3 oder 4 und k = 0 oder 1 ist oder

wenn E gleich eine CH₃-O-Gruppe ist, F gleich eine Oligo- oder Polyalkylenglycolkette der allgemeinen Formel -(CH₂)_d-[O-CH₂-CH₂]_vO-(CH₂)_m-(NH-CO-CH₂-O-CH₂)_k oder -(CH₂)_d-[O-CH(CH₃)-CH₂]_vO-(CH₂)_m-(NH-CO-CH₂-O-CH₂)_k mit d = 1, 2, 3 oder 4, v = eine ganze Zahl von 1 bis 1000, bevorzugt 1 bis 250, m = 0, 1, 2, 3 oder 4 und k = 0 oder 1 ist;

und G gleich -CO-NH- oder -NH-CO- ist.

20

4. Verbindung nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei U an 1, 2 oder 3 Positionen vorzugsweise mit einem Halogen, insbesondere Fluor oder Chlor, oder einem Methyl-, Ethyl-, Propyl-, Methoxy-, Ethoxy-, oder Propoxyrest substituiert ist.

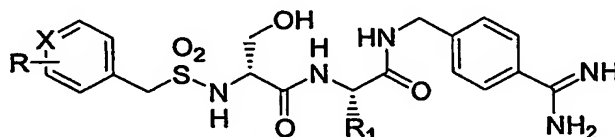
25

5. Verbindung nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei eine Carboxylgruppe als Ester, bevorzugt als Ethylester, geschützt vorliegt.

6. Verbindung nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 5 in Form eines Prodrugs, wobei R_9 und/oder R_{11} in diesem Fall ein Alkylcarbonyl-, Aralkylcarbonyl-, Alkyloxycarbonyl- oder Aralkyloxycarbonyl-Rest ist, wobei der Alkylrest vorzugsweise 1 bis 6, insbesondere 1 bis 4 C-Atome und der Arylrest vorzugsweise 5 bis 8, insbesondere 6 C-Atome besitzt.
7. Verbindung nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass im Amidinobenzylamidrest die Amidinogruppe in 4-Position steht und dass P_2 von der Aminosäure D-Ser abstammt und P_1 von Glycin, Alanin, Serin, Asparaginsäure oder Glutaminsäure abstammt und dass R_5 ein unsubstituierter oder mit einer Carboxylgruppe oder Carboxyalkylgruppe versehener Aryl- oder Aralkylsulfonyl-Rest mit 1 bis 16, vorzugsweise 1 bis 8, insbesondere 1 bis 4, vor allem 1 bis 2 C-Atomen im Alkylrest und 6 bis 14, vorzugsweise 6 bis 10, insbesondere 6 C-Atomen im Arylrest ist.
8. Verbindung nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass im Amidinobenzylamidrest die Amidinogruppe in 4-Position steht und dass P_2 die Aminosäure D-Ser und P_1 eine natürliche oder künstliche, unsubstituierte oder substituierte basische Aminosäure in der L-Konfiguration bedeutet, beispielsweise Lys, homoLys, Arg, norArg, homoArg, His, Orn, Orn(2-Imidazoliny), Dab, 4-[(2-Amino)Pyrimidinyl]Buttersäure, Dap, Ala[3-(2-Pyrrolidinyl)], Ala[3-Pyrrolidinyl-(2-N-Amidino)], Ala[3-(N-Piperazine-4-N-amidino)], Ala(4-Pip), Ala[4-Pip(N-amidino)], homoAla(4-Pip), Ala[3-Pip(N-amidino)], homoAla(3-Pip), homoAla[4-Pip(N-amidino)], Ala-(3-guanidino), Phe(3-Amidino), Phe(4-Amidino), Phe(3-NH₂), Phe(4-NH₂), Phe(3-Guanidino), Phe(4-Guanidino), Phe[4-(2-imidazoliny)], Phe[3-CH₂-(guanidino)], Phe[4-CH₂-(guanidino)], homoPhe(3-Amidino), homoPhe(4-Amidino), hPhe(3-NH₂), hPhe(4-NH₂), hPhe(3-Guanidino), hPhe(4-Guanidino), cis-Cha(4-NH₂), trans-Cha(4-NH₂), cis-homoCha(4-NH₂), trans-homoCha(4-NH₂), trans-Cha(4-CH₂NH₂), trans-homoCha(4-CH₂NH₂), und dadurch

gekennzeichnet, dass R_5 ein mit einer Sulfonylgruppe versehener Aryl- oder Aralkylsulfonyl-Rest mit 1 bis 16, vorzugsweise 1 bis 8, insbesondere 1 bis 4, vor allem 1 bis 2 C-Atomen im Alkylrest und 6 bis 14, vorzugsweise 6 bis 10, insbesondere 6 C-Atomen im Arylrest ist, der an die Aminogruppe des D-Ser gebunden ist.

9. Verbindung nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, dass P_1 die Aminosäure Lys oder Arg bedeutet.
10. Verbindung nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass der Substituent am substituierter Aryl-, Heteroaryl-, Aralkyl- oder Heteroaralkylrest ein Halogen, vorzugsweise Fluor, Chlor oder Brom, insbesondere Fluor oder Chlor, ist.
11. Verbindung nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, dass eine Verbindung der allgemeinen Formel I die folgende Struktur aufweist:



mit R gleich COOH , $\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_p$, $\text{R}_{18}\text{OOC}-(\text{CH}_2)_p$ mit $p = 1$ und 2 und $\text{R}_{18} = \text{Methyl}$ oder Ethyl , oder COOMe in ortho-, meta- oder para- oder H und X gleich CH und R_1 gleich H ; oder

R gleich 4- COOH oder 3- COOH mit X gleich CH und R_1 gleich H , CH_3 oder $\text{CH}_2\text{-OH}$; oder

R gleich 4- COOH oder 3- COOH mit X gleich CH und R_1 gleich H , CH_3 oder $\text{CH}_2\text{-OH}$; oder

R gleich 4- CN mit X gleich CH und R_1 gleich CH_3 ; oder

R gleich 4- $(\text{NH}_2\text{-CH}_2)$ mit X gleich CH und R_1 gleich H ; oder

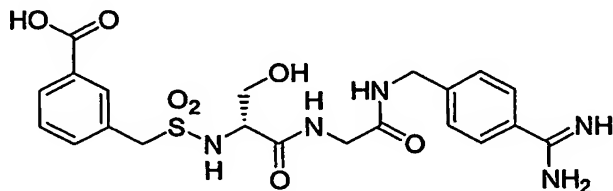
R gleich H mit X gleich CH und R₁ gleich H, CH₂-OH, CH₂-O(Bzl), CH₂-NH₂, CH(OH)CH₃ oder CH(OBzl)CH₃; oder

R gleich 4-COOMe mit X gleich CH und R₁ gleich CH₂-OH; oder

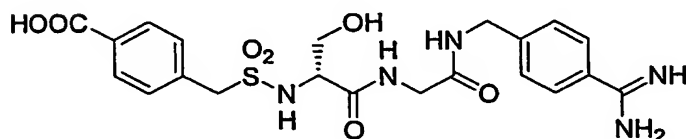
R gleich 4-CL, 4-Me, 4-F oder 3,4-Di-Cl mit X gleich CH und R₁ gleich H; oder

R gleich H mit X gleich N und R₁ gleich H.

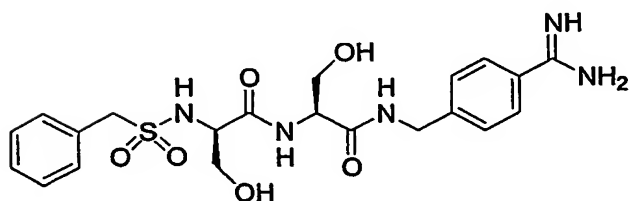
12. Verbindung nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, dass eine Verbindung der allgemeinen Formel I eine der folgenden Strukturen aufweist:



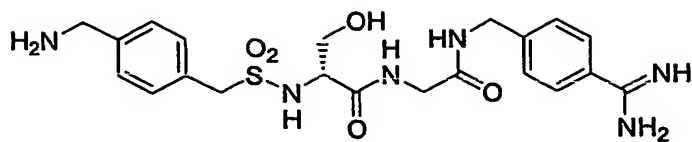
oder



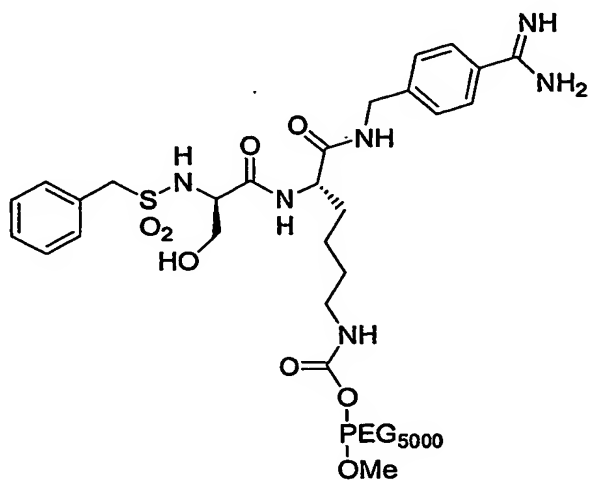
oder



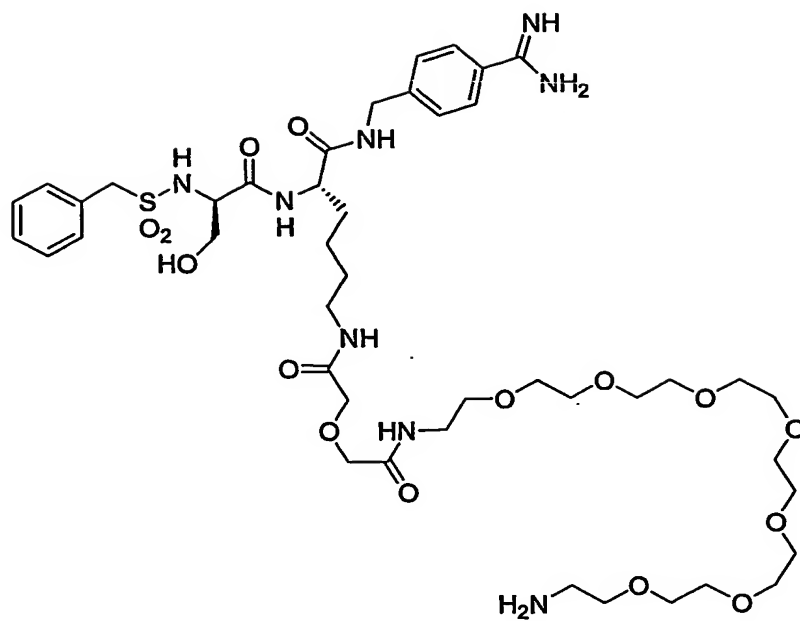
oder



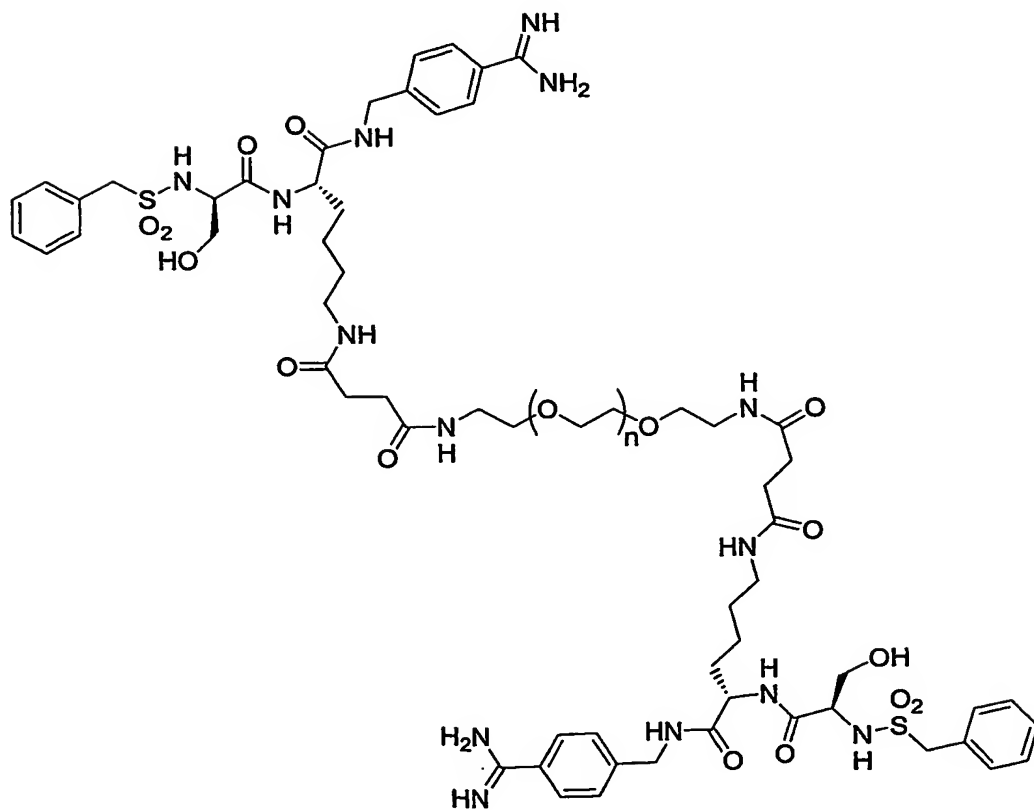
13. Verbindung nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, dass eine Verbindung der allgemeinen Formel I eine der folgenden Strukturen aufweist:



oder



oder



5

mit $n = 2$ bis 250.

14. Verbindung nach mindestens einem der Ansprüche 1-13, dadurch gekennzeichnet, dass die Verbindungen bevorzugt als Salze vorliegen, vorzugsweise mit Mineralsäuren, bevorzugt als Hydrochloride, oder vorzugsweise als Salze mit geeigneten organischen Säuren.
15. Verbindung nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, dass bevorzugte Salze von Mineralsäuren auch Sulfate sind und geeignete organische Säuren beispielsweise Essigsäure, Ameisensäure, Methylsulfonsäure, Bernsteinsäure, Apfelsäure oder Trifluoressigsäure sind, wobei bevorzugte Salze von organischen Säuren Acetate sind.
16. Verfahren zur Herstellung einer Verbindung gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 15, dadurch gekennzeichnet, dass sequentiell die entsprechenden Aminosäuren an ein 4-Acetyloxamidinobenzylamin angekoppelt werden, wobei die N-terminale Aminosäure entweder den R₅-Rest bereits trägt oder dieser anschließend daran gebunden wird.
17. Arzneimittel enthaltend eine Verbindung gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 15 sowie pharmazeutisch geeignete Hilfs- und/oder Zusatzstoffe.
18. Arzneimittel nach Anspruch 17, wobei das Arzneimittel in Form einer Tablette, eines Dragées, einer Kapsel, eines Pellets, Suppositoriums, einer Lösung, insbesondere einer Injektions- oder Infusionslösung, von Augen-, Nasen und Ohrentropfen, eines Safts, einer Kapsel, einer Emulsion oder Suspension, eines Globuli, Styli, Aerosols, Puders, einer Paste, Creme oder Salbe eingesetzt wird.
19. Verwendung einer Verbindung gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 15 oder eines Arzneimittels gemäß einem der Ansprüche 17 oder 18 zur Therapie oder Prophylaxe eines Tumors, insbesondere zur

Reduzierung der Bildung von Tumormetastasen, bevorzugt in oraler, subkutaner, intravenöser oder transdermaler Form.

- 5 20. Verwendung einer Verbindung gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 15 oder eines Arzneimittels gemäß einem der Ansprüche 17 oder 18 zur Diagnose eines Tumors.

10